

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VON
VERDÜNNERN ZUR SPERMAKONSERVIERUNG BEI
SCHWEIN, PFERD UND HUND UNTER BESONDERER
BERÜCKSICHTIGUNG PHYSIKALISCHER EIGENSCHAFTEN

CHRISTOPH KOBER

*Diss
München*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554825_0059

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Lehrstuhl: Prof. Dr. W. Leidl

Vergleichende Untersuchungen von Verdünnern zur Sperma-
konservierung bei Schwein, Pferd und Hund unter besonde-
rer Berücksichtigung physikalischer Eigenschaften

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Christoph Kober
aus
München

München
1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. W. Leidl

Korreferent: Priv.Do. Dr. Dr.habil. F. Graf

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

1.	VORWORT	1
2.	INHALT	2
3.	1. Die Bedeutung der menschlichen Existenz	3
4.	2. Die Stellung des Menschen in der Welt	4
5.	3. Die Stellung des Menschen in der Gesellschaft	5
6.	4. Die Stellung des Menschen in der Natur	6
7.	5. Die Stellung des Menschen in der Kunst	7
8.	6. Die Stellung des Menschen in der Wissenschaft	8
9.	7. Die Stellung des Menschen in der Religion	9
10.	8. Die Stellung des Menschen in der Philosophie	10
11.	9. Die Stellung des Menschen in der Ethik	11
12.	10. Die Stellung des Menschen in der Politik	12
13.	11. Die Stellung des Menschen in der Wirtschaft	13
14.	12. Die Stellung des Menschen in der Kultur	14
15.	13. Die Stellung des Menschen in der Literatur	15
16.	14. Die Stellung des Menschen in der Musik	16
17.	15. Die Stellung des Menschen in der Malerei	17
18.	16. Die Stellung des Menschen in der Architektur	18
19.	17. Die Stellung des Menschen in der Gartenkunst	19
20.	18. Die Stellung des Menschen in der Landschaftsgestaltung	20
21.	19. Die Stellung des Menschen in der Stadtplanung	21
22.	20. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsplanung	22
23.	21. Die Stellung des Menschen in der Umweltpolitik	23
24.	22. Die Stellung des Menschen in der Energiepolitik	24
25.	23. Die Stellung des Menschen in der Raumordnung	25
26.	24. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	26
27.	25. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	27
28.	26. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	28
29.	27. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	29
30.	28. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	30
31.	29. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	31
32.	30. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	32
33.	31. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	33
34.	32. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	34
35.	33. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	35
36.	34. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	36
37.	35. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	37
38.	36. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	38
39.	37. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	39
40.	38. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	40
41.	39. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	41
42.	40. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	42
43.	41. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	43
44.	42. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	44
45.	43. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	45
46.	44. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	46
47.	45. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	47
48.	46. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	48
49.	47. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	49
50.	48. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	50
51.	49. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	51
52.	50. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	52
53.	51. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	53
54.	52. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	54
55.	53. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	55
56.	54. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	56
57.	55. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	57
58.	56. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	58
59.	57. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	59
60.	58. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	60
61.	59. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	61
62.	60. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	62
63.	61. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	63
64.	62. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	64
65.	63. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	65
66.	64. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	66
67.	65. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	67
68.	66. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	68
69.	67. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	69
70.	68. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	70
71.	69. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	71
72.	70. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	72
73.	71. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	73
74.	72. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	74
75.	73. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	75
76.	74. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	76
77.	75. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	77
78.	76. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	78
79.	77. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	79
80.	78. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	80
81.	79. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	81
82.	80. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	82
83.	81. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	83
84.	82. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	84
85.	83. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	85
86.	84. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	86
87.	85. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	87
88.	86. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	88
89.	87. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	89
90.	88. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	90
91.	89. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	91
92.	90. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	92
93.	91. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	93
94.	92. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	94
95.	93. Die Stellung des Menschen in der Umweltenwicklung	95
96.	94. Die Stellung des Menschen in der Energieentwicklung	96
97.	95. Die Stellung des Menschen in der Raumentwickung	97
98.	96. Die Stellung des Menschen in der Regionalentwicklung	98
99.	97. Die Stellung des Menschen in der Stadtentwicklung	99
100.	98. Die Stellung des Menschen in der Verkehrsentwicklung	100

MEINEN ELTERN
IN DANKBARKEIT

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATUR	2
2.1.	Die Bedeutung von Verdünnerbestandteilen bei der Spermakonservierung	2
2.2.	Der Einfluß des pH und des osmotischen Druckes bei der Spermakonservierung	7
2.3.	Flüssigkonservierung von Ebersperma	11
2.4.	Flüssigkonservierung von Hengstsperma	15
2.5.	Tiefgefrierkonservierung von Hengst- sperma	16
2.6.	Flüssigkonservierung von Rüdensperma	18
2.7.	Tiefgefrierkonservierung von Rüden- sperma	20
2.8.	Die extrazelluläre GOT-Aktivität als Indikator für Membranschädigungen der Spermienzelle	22
2.9.	Akrosomalterationen durch Spermakonser- vierung	24
3.	EIGENE UNTERSUCHUNGEN	27
3.1.	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1.1.	Samenspender	27
3.1.2.	Spermagewinnung	28
3.1.2.1.	Spermagewinnung beim Eber	28
3.1.2.2.	Spermagewinnung beim Hengst	28
3.1.2.3.	Spermagewinnung beim Rüden	28
3.1.3.	Spermauntersuchung	29
3.1.3.1.	Untersuchung des unverdünnten Spermas	29
3.1.3.2.	Untersuchung des verdünnten Spermas	29

II

3.1.3.2.1.	Messung von pH und Osmolalität	29
3.1.3.2.2.	Motilität	30
3.1.3.2.3.	Lebend-Tot-Färbung	30
3.1.3.2.4.	Quantitative photometrische Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)	30
3.1.3.2.5.	Akrosomintegrität	31
3.1.4.	Herstellung der Verdünner	32
3.1.5.	Rezepturen der verwendeten Verdünner	33
3.1.5.1.	Verdünner zur Flüssigkonservierung von Ebersperma	33
3.1.5.2.	Verdünner zur Flüssigkonservierung von Hengstsperma	34
3.1.5.3.	Verdünner zur Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma	36
3.1.5.4.	Verdünner zur Flüssigkonservierung von Rüdensperma	37
3.1.5.5.	Verdünner zur Tiefgefrierkonservierung von Rüdensperma	38
3.1.6.	Flüssigkonservierung von Ebersperma - Versuchsdurchführung	38
3.1.6.1.	Verdünnung und Lagerung des Eberspermas	38
3.1.6.2.	Parameter der Untersuchung	39
3.1.6.3.	Versuchsaufbau	39
3.1.6.3.1.	Modifizierung des pH	40
3.1.6.3.2.	Modifizierung der Osmolalität	40
3.1.6.3.3.	Einfluß eines Zusatzes von Bovinem Serum Albumin	41
3.1.7.	Flüssigkonservierung von Hengstsperma - Versuchsdurchführung	41
3.1.7.1.	Verdünnung und Lagerung des Hengst- spermas	41
3.1.7.2.	Parameter der Untersuchung	42
3.1.7.3.	Versuchsaufbau	42

3.1.7.3.1.	Modifizierung des pH	42
3.1.7.3.2.	Modifizierung der Osmolalität	43
3.1.7.3.3.	Zentrifugation	43
3.1.8.	Tiefgefrierkonservierung von Hengst- sperma - Versuchsdurchführung	43
3.1.8.1.	Verdünnung und Lagerung des Hengst- spermas	43
3.1.8.2.	Parameter der Untersuchung	44
3.1.8.3.	Versuchsaufbau	45
3.1.8.3.1.	Modifizierung des pH	45
3.1.8.3.2.	Modifizierung der Osmolalität	45
3.1.8.3.3.	Variation des Glyzerinanteils	46
3.1.9.	Flüssigkonservierung von Rüdensperma - Versuchsdurchführung	46
3.1.9.1.	Verdünnung und Lagerung des Rüdens- spermas	46
3.1.9.2.	Parameter der Untersuchung	46
3.1.9.3.	Versuchsaufbau	47
3.1.9.3.1.	Tri-Natriumzitat-2-Hydrat	47
3.1.9.3.2.	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	48
3.1.10.	Tiefgefrierkonservierung von Rüdens- sperma - Versuchsdurchführung	48
3.1.10.1.	Verdünnung und Lagerung des Rüdens- spermas	48
3.1.10.2.	Parameter der Untersuchung	48
3.1.10.3.	Versuchsaufbau	49
3.1.10.3.1.	Modifizierung des pH	49
3.1.10.3.2.	Modifizierung der Osmolalität	49
3.1.11.	Reagenzien und Laborgeräte	50
3.1.12.	Statistische Methoden	52
3.2.	ERGEBNISSE	52
3.2.1.	Flüssigkonservierung von Ebersperma	52

3.2.1.1.	Untersuchungen mit den Originalrezepturen des Beltsville-, Kiew- und Zorlesco-Verdünners	52
3.2.1.2.	Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen	56
3.2.1.2.1.	Modifizierung des pH	56
3.2.1.2.2.	Modifizierung der Osmolalität	58
3.2.1.2.3.	Einfluß einer Zugabe von BSA zum Beltsville- und Kiew-Verdünnern	60
3.2.2.	Flüssigkonservierung von Hengstsperma	61
3.2.2.1.	Untersuchungen mit den Originalrezepturen des Glukose-Eidotter-Verdünners nach GÖTZE (1949), des Magermilchverdünners nach COOPER und WERT (1975) sowie des Dimitropoulos Mediums nach VAN DER HOLST (1983)	61
3.2.2.2.	Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen	64
3.2.2.2.1.	Modifizierung des pH	64
3.2.2.2.2.	Modifizierung der Osmolalität	66
3.2.2.2.3.	Zentrifugation	67
3.2.3.	Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma	69
3.2.3.1.	Untersuchungen mit den Originalrezepturen des Laktose-Eidotter-Verdünners nach MERKT und KRAUSE (1966), des Zweiphasenverdünners nach MARTIN, KLUG und GÖNZEL (1979) sowie des Laktose-ADTA-Verdünners nach NAUMENKOV und ROMANKOVA (1981)	69
3.2.3.2.	Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen	71

3.2.3.2.1.	Modifizierung des pH	71
3.2.3.2.2.	Modifizierung der Osmolalität	72
3.2.3.2.3.	Variation des Glycerinanteils	74
3.2.4.	Flüssigkonservierung von Rüdensperma	75
3.2.4.1.	Untersuchungen mit den Originalrezepturen des Natriumzitat-Verdünnern nach FOOTE und LEONHARD (1964) sowie des TRIS-Verdünnern nach GILL et al. (1970)	75
3.2.4.2.	Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen	77
3.2.4.2.1.	Tri-Natriumzitat-2-Hydrat	77
3.2.4.2.2.	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	79
3.2.5.	Tiefgefrierkonservierung von Rüdensperma	81
3.2.5.1.	Untersuchungen mit den Originalrezepturen des TRIS-Verdünnern nach GILL et al. (1970) sowie des Laktose-Eidotter-Verdünnern nach SEAGER (1969)	81
3.2.5.2.	Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen	84
3.2.5.2.1.	Modifizierung des pH	84
3.2.5.2.2.	Modifizierung der Osmolalität	86
4.	DISKUSSION	88
5.	ZUSAMMENFASSUNG	100
6.	SUMMARY	102
7.	LITERATURVERZEICHNIS	104

1. EINLEITUNG

Für die Besamungspraxis ist es von Bedeutung, inwiefern das eingesetzte Sperma bereits bei der Verdünnung und während der Lagerung beeinflusst wird, nachdem zwischen Qualität des verdünnten Spermas und den erzielten Befruchtungsergebnissen eine positive Beziehung besteht. Wichtige Faktoren, die die Vitalität und das Befruchtungsvermögen der Spermien mitbestimmen, sind physikalische und chemische Eigenschaften der Verdünner. Diese Eigenschaften sind das Ergebnis der Zusammensetzung der Verdünner, der Ionenkonzentration und des osmotischen Druckes.

Die in der Literatur erwähnten Verdünner differieren in bezug auf die Puffersubstanzen und hochmolekularen Bestandteile, pH und osmotischer Druck weisen zum Teil deutliche Unterschiede auf. Die Vielzahl der unterschiedlichen Verdünner läßt den Schluß zu, daß bei der Entwicklung von Spermaverdünnern meist empirisch vorgegangen wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden in der Praxis der künstlichen Besamung bewährte Verdünner zur Spermakonservierung beim Eber, Hengst und Rüden unter besonderer Berücksichtigung des pH, des osmotischen Druckes und einzelner Verdünnerkomponenten vergleichend untersucht.

2. LITERATUR

2.1. Die Bedeutung von Verdünnerbestandteilen bei der Spermakonservierung

Zur Spermakonservierung (Flüssigkonservierung) sollte ein Verdünner folgende Eigenschaften aufweisen:

- eine ausreichende Pufferkapazität gegen die Einwirkung schädigender Stoffwechselprodukte auf die Spermien besitzen
- gute Konservierungseigenschaften haben und keine spermatoxischen Bestandteile enthalten
- der osmotische Druck sollte dem Sperma entsprechen
- nicht zuviel durch die Membranen penetrieren
- gut wasserlöslich und stabil sein.

Verdünner, die für die Tiefgefrierkonservierung eingesetzt werden, sollten darüber hinaus Nähr- und Schutzstoffe als Kryoprotektiva enthalten, die Vitalität und Befruchtungsvermögen der Spermien nach dem Auftauen erhalten.

Ein Effekt der Verdünnerbestandteile besteht in einer Stabilisierung der Spermienmembran. Ferner werden Komplexe mit Elektrolyten gebildet, die ansonsten in freier Form die Spermienaktivität erhöhen und die Lebensdauer verkürzen würden. Schließlich kommt es durch die im Verdünner gelösten Komponenten zu einer Stabilisierung des pH. Aus der Literatur ist zu ersehen, daß bis jetzt für die Samenkonservierung nur wenige Substanzen routinemäßig Verwendung fanden. Neben einigen Nicht-elektrolyten und Elektrolyten werden teilweise hochmolekulare Substanzen (Makromoleküle wie z.B. Bovines Serum Albumin) eingesetzt. Zur Tiefgefrierkonservierung finden Kryoprotektiva wie Eidotter, Glyzerin und Orvus-Es Paste Anwendung. Bei den Nicht-elektrolyten, die in Verdünnern als Nährsubstrate fungieren, sind vor allem Fruktose und Laktose wichtig. DEMINATUS (1956) vertritt die Auffassung, daß der Einfluß von Zuckern bei der Gefrierkonservierung nicht nur nutritiver Art ist, sondern von

ihnen als Nichtelektrolyten auch stabilisierende Eigenschaften im Verdünnungsmedium ausgehen, die sich auch auf die osmotischen Verhältnisse im Sperma verdünner während des Gefrierprozesses günstig auswirken.

In Lösungen, die eine schwache Säure und korrespondierende Base (z.B. Essigsäure und Natriumacetat) oder eine schwache Base und ihre korrespondierende Säure (z.B. Ammoniak und Ammoniumchlorid) enthalten, bleibt der pH bei Säure- oder Basenzusatz nahezu konstant. Solche Lösungen werden als Pufferlösungen bezeichnet. Die am häufigsten verwendeten Puffersubstanzen basieren auf Natriumzitrat, Hydrogencarbonat bzw. Phosphat. Aus der Henderson Hesselbalch'schen Gleichung:

$$\text{pH} = \text{pK}_s + \log \frac{[\text{Base}]}{[\text{Säure}]}$$

folgt, daß in jeder Pufferlösung der pH vom pK_s (negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante) und vom Verhältnis zwischen Base und Säure abhängig ist. Demnach ist es möglich, für beliebige pH Werte das Verhältnis zwischen Base und Säure auszurechnen und demgemäß die absoluten Konzentrationen der beiden Pufferkomponenten zu bestimmen.

Medien aus Tris (hydroxymethyl)-aminomethan $[\text{NH}_2\text{-C} \equiv (\text{CH}_2\text{OH})_3]$ enthalten zwei Pufferkomponenten: die unprotonierten und die protonierten Moleküle. Erstere können sowohl mit ihren NH_2 -Gruppen als auch mit alkoholischen OH-Gruppen Wasserstoffbrückenbindungen eingehen. Die Triskationen regulieren den pH-Wert und bilden mit den negativ geladenen Gruppen auf der Spermienoberfläche ionische Bindungen. Die neutralen Moleküle penetrieren in den intrazellulären Raum und fungieren dort als Akzeptor von H^+ Ionen. Dadurch wird die intrazelluläre Azidität erniedrigt. Wegen der Bindung der H^+ Ionen an Tris verändert sich auch die Formation der intrazellulären Proteinmoleküle, was einen günstigen Wandel des Zellzustandes zur Folge haben kann (SENEGACNIK, 1982).

Xthylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (XDTA) bildet ziemlich stabile Komplexe mit verschiedenen, besonders zweiwertigen Kationen. Dadurch wird den Spermien und der Mikroflora ein bestimmter Teil der betreffenden Kationen entzogen, was in einer partiellen Anabiose resultieren kann. SENEGACNIK (1982) wies die inhibitorische Wirkung von XDTA und TRIS bei tiefgefrorenem und aufgetautem Eber- und Bullensperma nach. Die Inhibitorwirkung zeigte sich in einer verringerten Fruktolyserate, in einem geringeren Verlust intrazellulärer GOT und führte zu einer besseren Motilitätsrate nach dem Auftauen. Auch ABDU und EL-GUINDI (1977) beobachteten den inhibitorischen Einfluß von XDTA auf die Fruktolyserate von Bullensperma. Der fruktolysehemmende Effekt beruht auf einer Hemmung glykolytischer Enzyme. So kann XDTA die Adenosintriphosphataseaktivität im Sperma reduzieren (VOGLMAYR et al., 1969) und dadurch die Energieversorgung der Zelle und ihre Lebensfähigkeit verbessern. QUINN und WHITE (1968) untersuchten den Effekt von XDTA und Lecithin auf Schafbockspermien, die einem Kälteschock ausgesetzt worden waren. Die Motilität war in Anwesenheit von XDTA besser als bei Lecithin; der Schutz gegenüber Permeabilitätsänderung der Spermienzelle, ausgedrückt durch den Anstieg intrazellulären Kalziums, war bei beiden Substanzen gleich. BREDDERMANN und FOOTE (1971) stellten einen ausgeprägten stabilisierenden Effekt von XDTA und Bovinem Serum Albumin auf das Zellvolumen von Bullenspermien fest. Die Wirkung von XDTA ist von der Konzentration im Medium abhängig. BERNSTEIN (1958) stellte bei Humanspermien fest, daß 1 mM XDTA den O_2 Verbrauch nicht inhibierte, während 10 mM zunächst den O_2 Verbrauch stimulierten und dann inhibierten. Humanspermien, die durch XDTA immobilisiert wurden, konnten bei 1 mM XDTA Konzentration durch Kalzium und bei 10 mM durch Magnesium reaktiviert werden. Der Autor schloß daraus, daß XDTA die Motilität hemmt, indem es den Spermien Kalzium oder Magnesium entzieht.

Seit der Entdeckung, daß Eidotter gegen Kälteschock schützt (PHILLIPS, 1939), wird Eidotter als essentieller Be-

standteil von Verdünnern verwendet. Die Mechanismen, durch die Eidotter gegen den Kälteschock und während des Tiefgefrierens schützt, sind noch nicht eindeutig geklärt. Wahrscheinlich wirkt Eidotter durch die Stabilisierung der Spermienmembran und die Aufrechterhaltung des kolloidalen Druckes des externen Mediums. Es wurde versucht, die aktive Eidotterkomponente zu identifizieren. Phospholipide (KAMPSCHMIDT et al., 1953), verschiedene Lipidextrakte, Lipoprotein-Fraktionen (BIALY et al., 1957), Phosphatidylcholin (MARTIN, 1963 c; LANZ et al., 1965) und spezifische Lipoproteine (FOULKES, 1977) haben sich als effektiv erwiesen, die Spermienaktivität nach dem Tiefgefrieren und Auftauen zu erhalten. Nach FOULKES (1977) schützt Eidotter die Spermienmembran und verhindert die Freisetzung von löslicher Hyaluronidase. Insbesondere Lipoprotein 3 wird an die Spermienmembran gebunden und entwickelt dabei protektive Eigenschaften.

Magermilch wird als Verdünner verwendet, da sie in ausgewogener Form Elektrolyte, Eiweiß und Kohlenhydrate enthält. Nicht erhitzte, frische Magermilch ist jedoch als Verdünnerbestandteil für Bullenspermien toxisch. Der toxische Faktor wird durch Erhitzen der Milch auf + 92° C inaktiviert (THACKER und ALMQUIST, 1953). FLIPSE et al. (1954) wiesen Lactenin als spermiziden Faktor nach. Der Zusatz von Cystein-Hydrochlorid, einer schwefelhaltigen Aminosäurenverbindung, zur unerhitzten Magermilch führt zu einem Freisetzen von Sulfhydrylgruppen, die Lactenin inaktivieren. Cystein-Hydrochlorid erhält die Motilität von verdünntem Bullensperma besser als das Erhitzen der Magermilch auf + 92° C (JOHNSON et al., 1955). Neben Cystein wird auch die Aminosäure Glycin (früher Glykokoll genannt) als Verdünnerbestandteil verwendet. Nach Untersuchungen von ROY und BISHOP (1954) verlängert Glycin die Motilitätsdauer von Bullenspermien. Die Wirkung von Glycin beruht auf einer Komplexbindung von Elektrolyten, die die Aktivität von Spermien stimulieren und so die Überlebensdauer verkürzen. Außerdem soll es die Membranin-

tegrität der Spermienzelle erhalten.

BREDDERMANN und FOOTE (1971) zeigten, daß Bovines Serum Albumin (BSA) die Motilität von Bullensperma nach der Verdünnung verlängert. Diese protektive Wirkung hochmolekularer Substanzen wurde auch von EMMENS und SWYER (1948), BLACKSHAW (1953), LINDHOLMER (1974), HARRISON, DOTT und FOSTER (1978), GOODEAUX und KREIDER (1978) beobachtet. Bei PAQUIGNON et al., (1980 b) führte der Zusatz von BSA zum Illinois Variable Temperature (IVT)-, Beltsville- und Kiew-Verdüner zu einer signifikanten Verbesserung der Motilitätsraten bei verdünntem Ebersperma. BSA wird an die Plasmamembran adsorbiert (STANGER und QUINN, 1983) und inhibiert dort die Peroxidation von Membranlipiden (ALVAREZ und STOREY, 1983). Neben Albumin schützen auch Taurin, Hypotaurin und Epinephrin die Spermienmembran vor Lipid oxidation und die Spermien vor raschem Motilitätsverlust; Bovines Serum Albumin hat sich jedoch als am effektivsten erwiesen (ALVAREZ und STOREY, 1983).

POLGE, SMITH und PARKES (1949) entdeckten, daß Glyzerin Samenzellen vor den schädigenden Gefrier- und Auftauvorgängen schützen kann. Die erfolgreiche Gefrierkonservierung von Spermien mit befriedigenden Auftau- und Befruchtungsergebnissen wurde jedoch bei den meisten Tierarten erst ein bis zwei Jahrzehnte später entwickelt. Als vorrangiges Hindernis bei der Entwicklung von Spermatiefgefrierverfahren hat sich die paradoxe Situation erwiesen, daß Glyzerin einerseits als Kryoprotektivum wirkt, gleichzeitig jedoch zu einer Reduzierung des Befruchtungsvermögens, insbesondere beim Schwein (POLGE, 1956; NEVILLE et al., 1970; GRAHAM et al., 1971), beim Huhn (POLGE, 1951) und beim Pferd (PICKETT et al., 1975 a; DEMICK et al., 1976) führt.

Die Suche nach einem anderen, geeigneten Kryoprotektivum war nur wenig erfolgreich (GRAHAM und CRABO, 1972; WILMUT und

POLGE, 1977 a; SCHEID, 1980). WILMUT und POLGE (1977 b) untersuchten verschiedene Zuckermedien mit Eidotter als Glycerinerersatz zur Tiefgefrierkonservierung von Ebersperma. Wenn die Verdüner Glycerin enthielten, wurde gute Motilität nach dem Auftauen in Verdünnern mit Glukose, nicht aber in Verdünnern mit Fruktose beobachtet. In Verdünnern ohne Glycerin erhielt dagegen Fruktose die Motilität am besten aufrecht, während bei Glukose fast keine Motilität vorhanden war. Demnach bestanden komplexe Interaktionen zwischen den Verdünerbestandteilen. GRAHAM et al., (1971) berichteten, daß die Zugabe von Orvus-Es Paste (OEP) die Tiefgefrierschäden bei Eberspermien reduziert. OEP besteht aus Natrium- und Äthanolaminsulfat und besitzt emulgierende Eigenschaften. OEP wurde daher in verschiedenen Tiefgefriermedien für Ebersperma (ROMENY et al., 1974; PURSEL und JOHNSON, 1975; PURSEL et al., 1978) und für Hengstsperma (MARTIN, KLUG und GÖNZEL, 1979) verwendet.

Die Wirkungsweise der Kryoprotektiva, d.h. der genaue Mechanismus durch den diese Substanzen während des Tiefgefrierens schützen bzw. schädigen, bleibt allerdings ungeklärt. Eine übersichtliche Zusammenfassung der wichtigsten Theorien über dieses Thema stellte WEITZE (1977 b) vor.

2.2 Der Einfluß des pH und des osmotischen Druckes bei der Spermakonservierung

Über den Einfluß des pH auf die Spermien lassen sich keine allgemein gültigen Aussagen machen. Während einige Autoren von einer Zunahme der Spermienmotilität im alkalischen Bereich berichten, stellen andere fest, daß die Motilität bei geringerer Hydrogenionenkonzentration länger aufrecht erhalten wird, als bei einem hohen pH-Wert. Eine leichte Verschiebung des pH in den alkalischen Bereich führte bei Humanspermien zu einer Zunahme der Bewegungsintensität (MAKLER et al., 1981). Spermien,

die im sauren Bereich immobilisiert wurden, erlangten ihre Motilität zurück, wenn der pH wieder die ursprünglichen Werte erreichte. In Untersuchungen von VAN DUIJN und RIKMENSPOEL (1960) bestand bei verdünntem Bullensperma im Bereich pH 5,7 - 7,5 eine direkte Beziehung der Spermengeschwindigkeit zum pH. Für einige Ejakulate galt diese Beziehung bis zu einem Bereich von pH 8,0.

EMMENS (1947) verwendete einen gepufferten Dextrose-Verdünner mit einem pH von 4,4 - 10,2 und untersuchte den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und den Prozentsatz lebender Spermien in tiefgefrorenem Kaninchensamen nach dem Auftauen. Der Autor stellte fest, daß Spermien im sauren Bereich stärker als im alkalischen Bereich geschädigt werden; unterhalb eines pH von 5,8 sind sie unbeweglich und sterben rasch ab, bei einem pH von 9,5 - 10,0 hingegen bleiben sie motil und überleben mehrere Stunden trotz reduzierter Motilität. In weiterführenden Untersuchungen zeigten BLACKSHAW und EMMENS (1951), daß hypotone Glukose- und Natriumchlorid-Verdüner die Motilität von Schafbock-, Bullen- und Humanspermien stärker reduzieren als hypertone Verdüner. Neben der Tonizität wurde die Motilität der Spermien vom pH der Verdüner beeinflusst; Schafbock- und Bullenspermien waren um den pH 7,0 beweglich, Humanspermien um den pH 8,5. Auch CHANG und THORSTEINSSON (1958) stellten beim Kaninchen einen wechselseitigen Einfluß von pH und Osmolarität auf den Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und die Konzeptionsraten fest. Das Befruchtungsvermögen einer Samenprobe wurde durch eine hypotone Lösung stärker beeinträchtigt als durch eine isotone Lösung mit hohem oder niedrigem pH. STEINBACH und FOOTE (1967) beobachteten bei TRIS-verdünnten, tiefgefrorenen Bullenspermien, daß der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien nach dem Auftauen bei geringerer Hydrogenionenkonzentration weniger abnahm. Der Verdünner mit dem geringsten Motilitätsverlust enthielt 0,2 M TRIS bei einem pH-Wert von 7,5. Eine Reduzierung des pH von 7,0 auf 6,5 bei einem

Zitrat-Verdüner führte bei Besamung mit tiefgefrorenem Bullensperma zu keiner Beeinträchtigung der Non-return Raten (FOOTE, 1970).

Der optimale pH Bereich für Verdünerlösungen von Schafbockspermien scheint mehr im sauren Bereich zu liegen. Bei Verwendung einer Phosphat gepufferten Glukose-Lösung wurden optimale Werte für Motilität, Bewegungsaktivität und Motilitätsdauer im Bereich 6,0 - 6,5 erzielt (BARTOOV und MAYEVSKY, 1980). QUINN und WHITE (1968) ermittelten Motilität und Prozentsatz lebender Schafbockspermien, die mit einem Natriumphosphat Puffer verdünnt worden waren. In einem Bereich von 7,6 - 6,0 stellten sie dabei eine zunehmende Resistenz gegenüber Kälteschock bei abnehmendem pH fest.

Wie bereits erwähnt, werden Vitalität und Befruchtungsvermögen der Spermien neben dem pH auch durch den osmotischen Druck beeinflusst. Allgemein gilt, daß hypotone Lösungen auf die Spermien einen negativen Einfluß ausüben; neben einer Zunahme von Membranschädigungen kommt es zu einem stärkeren Abfall der Motilität als in hypertonen Lösungen. DREVIUS (1972) sowie DREVIUS und ERIKSON (1966) stellten bei abnehmender Osmolalität ein Anschwellen der Spermien sowie vermehrt Krümmlinge fest. In Untersuchungen von MAKLER et al. (1981) reduzierten eine hypotone Lösung Geschwindigkeit und Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien von Humansperma stärker als eine hypertone Lösung. Die Geschwindigkeit der Spermien war bei 400 mOsm/kg am höchsten.

Nach SMIRNOV und YEMETZ (1972) besteht eine lineare Beziehung zwischen osmotischem Druck im Ejakulat und der Toleranz der Spermien gegenüber Tiefgefrieren. Die Motilität von Bullenspermien nach dem Auftauen stieg an, wenn der osmotische Druck vor dem Einfrieren erhöht wurde.

FISER und LANGFORD (1981) verdünnten Schafbockspermien mit einem Laktose-Eidotter-Verdüner und kühlten das Sperma auf

+ 5° C ab. Anschließend wurden die Proben mit hypotonen (200 mOsm/kg), isotonen (320 mOsm/kg) oder hypertonen (450/600/750 mOsm/kg) Magermilch-Verdünnern nachverdünnt. Jeder Verdünner enthielt 11,25% Glycerin, der pH wurde auf 6,65 - 6,70 eingestellt. Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien stieg mit zunehmender Osmolalität des Tiefgefrierverdünners. Die Verdünner mit 600 und 750 mOsm/kg erzielten die höchsten Auftauraten. Die Fertilitätsraten nach Besamung mit Frischsamen lagen bei 79% und bei 68% mit Samen, der mit hypertonem (600 mOsm/kg) Verdünner verdünnt und bei + 39° C aufgetaut wurde. TISCHNER et al. (1980) untersuchten die Bewegungsaktivität von Hengstsperma, das mit Glukoselösung verdünnt wurde, bei unterschiedlichem osmotischen Druck und pH. Zwischen 223 und 285 mOsm war die Bewegungsaktivität am höchsten, jedoch traten hier auch die meisten abnormen Bewegungen auf. Von 285 mOsm bis zu einem Wert von 370 mOsm nahm der Anteil abnormer Bewegungen signifikant ab; ebenso kam es zu einer leichten Verringerung der Bewegungsaktivität. Bei einem konstanten osmotischen Druck von 320 mOsm war die Bewegungsaktivität in einem Bereich von pH 6 bis pH 8 am höchsten. SCHILLING et al. (1984) inkubierten frisch ejakuliertes Ebersperma 15 oder 120 Minuten in einem Standardmedium bei unterschiedlichem osmotischen Druck von 150 bis 500 mOsm. Die degenerativen Veränderungen der Akrosommembran wurden als Prozentsatz von Akrosomen mit normalem apikalen Rand (NAR) quantifiziert und als osmotischer Resistenzwert bezeichnet. Dabei wurde der NAR Wert im isotonen Verdünner mit den Ergebnissen des Verdünners mit 150 und 500 mOsm verglichen. Der osmotische Resistenzwert ist eng korreliert mit der Tiefgefrierfähigkeit und Langzeitlagerungsfähigkeit (über 3 Tage Lagerung) von Ebersperma. Ebenso bestehen hohe Korrelationen für die Motilität der Spermaproben nach der Lagerung. Der osmotische Resistenzwert ist auch ein Kriterium für die Spermienreife, er ist bei zu häufiger Spermagewinnung niedrig.

2.3. Flüssigkonservierung von Ebersperma

Die Schweinebesamung und damit der Einsatz von flüssigkonserviertem Ebersperma gewinnt zunehmend an Bedeutung. Breite Anwendung hat dabei der Kiew-Verdünner gefunden, weitere routinemäßig gebräuchliche Verdünner sind der BL-1 Verdünner (Beltsville-Verdünner), der SCK 7-Verdünner, das Zorlesco-Medium und der BTS-Verdünner (Beltsville Thawing Solution).

HAEGER und MÄCKLE (1971) entwickelten in Anlehnung an Arbeiten von PLISKO (1965) einen Zweiphasenverdünner zur Schweinebesamung. Dem Ejakulat wird zunächst ein Verdünner zugesetzt, der den Stoffwechsel der Spermien reduziert und somit die Lebensdauer der Spermien verlängern soll. Dies wird durch die Verwendung von Äthylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (ADTA) erreicht. Der zweite Verdünner wird erst unmittelbar vor der Besamung zugesetzt und hebt die Stoffwechselhemmung des ersten Verdünners wieder auf. Bei + 20° C bis + 22° C läßt sich das Sperma ohne nennenswerten Befruchtungsverlust mit Kiew-Verdünner 3-4 Tage lagern; die Non-return Raten bei Besamung mit 1-3 Tage altem Sperma lagen bei 82, 82 und 83%. Eine Verdünnung allein mit der ersten Komponente des Zweiphasenverdünners ohne weitere Nachverdünnung bei der Insemination kann jedoch offenbar zu gleich guten Non-return Ergebnissen führen (SIMMET, 1974, HEYDORN und PAUFLER, 1975). Der Kiew-Verdünner wird daher heute wegen niedrigerer Kosten und aus Gründen der einfacheren Handhabung hauptsächlich als einphasiger Glukose-ADTA-Verdünner verwendet (Rezeptur siehe S. 33).

Der BL-1 Verdünner (PURSEL et al., 1971) setzt sich wie der Kiew-Verdünner aus Glukose, Natriumzitrat, Natriumbikarbonat und Antibiotika zusammen; er enthält jedoch kein ADTA zur Stoffwechselhemmung, sondern Kaliumchlorid (Rezeptur siehe S. 33). JOHNSON et al. (1982) verglichen in ihren Untersuchungen den Kiew-Verdünner mit dem Beltsville-Verdünner. Das ver-

dünnte Sperma wurde vor der Insemination bis zu 3 Tage bei + 18° C aufbewahrt. Die Ferkelraten von 2849 besamten Sauen waren beim Kiew-Verdünner höher als beim BL-1 Verdünner (69% zu 61%).

Der Guelph-Verdünner (REED, 1976) gleicht in seiner Zusammensetzung mit Ausnahme des Natriumzitatanteiles dem Kiew-Verdünner; der Kiew-Verdünner enthält 0,375 g Tri-Natriumzitat-2-Hydrat, der Guelph-Verdünner 4,4 g Natriumzitat x 5,5 Hydrat. PAQUIGNON et al. (1979) kamen in ihren Untersuchungen zu dem Schluß, daß sich die Trächtigkeitsraten bei Anwendung des BL-1 Verdünners und des Guelph-Verdünners bis zum 2. Konservierungstag bei + 15° C nicht signifikant unterscheiden. Bei längerer Lagerungsdauer erwies sich der Guelph-Verdünner dem BL-1 Verdünner deutlich überlegen. Spätere Versuche bestätigten dieses Ergebnis (PAQUIGNON et al., 1980 a).

Der SCK 7-Verdünner (KEREGYARTO, 1977) wird zur Stoffwechselhemmung der Spermien mit Kohlendioxid gesättigt. Die Verdünnerrezeptur wurde bisher nicht veröffentlicht. In einem Feldversuch wurde mit 1 bis 5 Tage alten Samenportionen ein durchschnittliches Konzeptionsergebnis von 65% erzielt (FISCHER-PEREIRA, 1979). Mit Kiew-Verdünner hergestellte, bis zu 2 Tage alte Samenportionen erzielten in diesen Untersuchungen eine ähnliche Konzeptionsrate (64%). In parallel laufenden in-vitro Untersuchungen hingegen war die Spermienmotilität im SCK 7-Verdünner während der gesamten Versuchszeit deutlich geringer als in den mit Kiew-Verdünner konservierten Kontrollen. PAQUIGNON et al. (1980 a) lagerten Sperma, das mit Guelph- und SCK 7-Verdünner verdünnt wurde, bis zu 7 Tage bei + 15° C. Nach diesen Untersuchungen läßt sich eine Verlängerung der Lagerungszeit mit dem SCK 7-Verdünner nicht erreichen.

Mit dem Ziel der Verlängerung der Konservierungsdauer und der Erhöhung der Befruchtungsergebnisse stellten GOTTARDI et

al. (1980) den Glukose-XDTA-Verdüner mit Bovinem Serum Albumin (BSA), das sogenannte Zorlesco Medium (Rezeptur siehe S. 34) her. Das verdünnte Sperma wurde bei + 18° C gelagert. Selbst mit 7 Tage altem Sperma wurden bei 72 besamten Sauen 51% Trächtigkeiten erzielt. Nach Untersuchungen von HARRISON, DOTT und FOSTER (1978) sowie PAQUIGNON et al. (1980 b) soll der Zusatz von BSA zum Verdüner eine positive Wirkung auf die Spermienmotilität in-vitro besitzen.

FAZANO et al. (1982) untersuchten den osmotischen Druck, die Motilität und Akrosomintegrität von Schweinesperma, das mit Zorlesco- oder XDTA-Verdüner (industriell hergestellter Kiew-Verdüner; Merck, Darmstadt) konserviert und 7 Tage bei + 15° C gelagert wurde. Die Motilität wurde durch den hypertonen Kiew-Verdüner (383 mOsm) und den hypotonen Zorlesco-Verdüner (244 mOsm) nicht unterschiedlich beeinflusst, der Anteil intakter Akrosome lag dagegen im Kiew-Verdüner bis zum 4. Tag deutlich über den Werten des Zorlesco-Verdüners. Am 7. Tag waren unabhängig von der Art des Verdünners sowohl Motilität als auch der Anteil an Akrosomen mit normalem apikalen Rand auf Werte unter 30% abgesunken. Nach Einstellung der Verdüner auf eine isotonische Osmolarität von 284 mOsm ergaben sich hinsichtlich der Motilität keine Unterschiede zwischen den Verdünnern, jedoch zeigte das isotonisch verdünnte Sperma einen deutlich geringeren Abfall der Motilität gegenüber den Originalverdünnern. Der Unterschied des Anteiles intakter Akrosome zwischen beiden Verdünnern wurde nach Einstellung auf isotonische Werte zum Nachteil des Zorlesco-Verdüners noch vergrößert. Eine Verlängerung der Lagerzeit mit dem Zorlesco-Verdüner dürfte nach FAZANO et al. (1982) daher nicht erreicht werden. STREZEZEK und SLAWETA (1984) verglichen Befruchtungsvermögen von Ebersperma, das 1 bis 3 Tage bei + 15° C bis + 18° C im Kiew-Verdüner konserviert wurde, mit in-vitro Untersuchungen der GOT- und Hyaluronidaseaktivität und der Akrosomintegrität. Bereits bei der Verdünnung kam es in Abhängigkeit vom Verdünnungsgrad zu

einer vermehrten Enzymfreisetzung und einer Abnahme der Spermienzahl mit normalem apikalen Rand. Die Konzeptionsraten nahmen signifikant ab, wenn das Sperma länger als 2 Tage gelagert wurde (85% bei 1 Tag altem Sperma und 61% bei 3 Tage altem Sperma). Der höchste Korrelationskoeffizient bestand zwischen freigesetzter GOT und der Ferkelrate ($r = 0,50$, $p \leq 0,01$). Wenn die freigesetzte GOT-Aktivität $300 \text{ mU}/10^9$ Spermien und die Hyaluronidase-Aktivität $1 \text{ U}/10^9$ Spermien übersteigt, so kann dies über den Grad des Alterungsprozesses im konservierten Sperma informieren und eine Abnahme der Fertilisationskapazität des Samens signalisieren.

Zum Auftauen von tiefgefrorenem Ebersperma benutzten PURSEL und JOHNSON (1975) den BTS-Verdüner (Beltsville-Thawing Solution). Die Auftaulösung BTS stellt eine modifizierte Form des Hülsenbergverdünners nach RICHTER und LIEDICKE (1972) dar; der osmotische Druck wurde durch Konzentrationsänderung der Verdünnersubstanzen Glukose und ADTA verringert. Der BTS-Verdüner wird heute auch zur Flüssigkonservierung von Ebersperma eingesetzt. AALBERS et al. (1983) verglichen unter Feldbedingungen die Fertilität von Ebersperma, das bei $+ 18 \pm 2^\circ \text{ C}$ im Kiew-, BTS- und Zorlesco-Verdüner konserviert wurde. Die Motilität nach 2-tägiger Lagerung betrug 41%, 42% bzw. 56%; 71%, 75% bzw. 65% der gesamten Sauen konzipierten. AMLID et al. (1984) mischten Samen von 3 Ebern und verdünnten ihn mit Kiew-, Zorlesco- bzw. BTS-Verdüner. Die Spermienmotilität war im Zorlesco- und BTS-Verdüner signifikant höher als im Kiew-Verdüner (Lagerungstemperatur $+ 15$ bis $+ 18^\circ \text{ C}$). 29 bis 40 Tage nach der Besamung mit 2 bis 4 Tage altem Sperma wurden die Sauen geschlachtet und die Anzahl corpora lutea sowie die Anzahl der Embryonen festgestellt. Ein signifikanter Einfluß auf die Trächtigkeitsrate oder Embryonenzahl war für keinen der verwendeten Verdünner nachzuweisen.

2.4. Flüssigkonservierung von Hengstsperma

Für die Flüssigsamenkonservierung werden Glukose-, Eidotter-, Milch- und TRIS-Verdüner verwendet.

EBERTUS (1962) stellte einen Verdüner aus Rindervollmilch her. Nach 48-stündiger Aufbewahrung war noch die Hälfte der anfangs geschätzten Spermien vorwärtsbeweglich. Bei Besamung mit über 40 Stunden altem Sperma konzipierten von 5 besamten Stuten alle. VLACHOS (1963) verdünnte Sperma mit entrahmter und pasteurisierter Rindermilch 1:5 bis 1:8. Das Sperma wurde auf $+ 4^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und zur Besamung am gleichen oder nächchsten Tag verwendet. Von 362 besamten Stuten konzipierten 41,9%. HUGHES und LOY (1970) versetzten Hengstsperma mit 1 bis 4 Teilen Magermilch- oder Vollmilch-Gelatine-Verdünnern und besamten innerhalb von 2 Stunden; wurde später besamt, so wurde das Sperma langsam auf 0 bis $+ 5^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und bis zur KB gelagert. Mit Magermilch verdünntes Sperma wurde nicht länger als 24 Stunden aufbewahrt. Besamungen bis zu 24 Stunden wurden mit gleichen Teilen Magermilch verdünntem und Vollmilch-Gelatine verdünntem Sperma, Besamungen nach 24 Stunden wurden mit Vollmilch-Gelatine-Verdünnern durchgeführt. 10 von 14 Stuten konzipierten mit 48 Stunden altem Sperma, 3 von 6 mit 72 Stunden altem Sperma und 2 von 3 Stuten mit 96 Stunden altem Sperma. Im Zusammenhang mit einem künstlichen Beleuchtungsprogramm zur Beeinflussung des Zyklusablaufes benutzten COOPER und WERT (1975) einen Magermilchpulver-Gelatine-Verdüner (Rezeptur siehe S. 34). Das verdünnte Sperma wurde 3 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Oberstand entfernt und das Sediment resuspendiert. 50% der besamten Stuten fohtlen.

PICKETT et al. (1975) verglichen Verdüner mit Konzentrationen von 0,349 bis 2,4% TRIS. Bei Besamung innerhalb einer Stunde nach Spermagewinnung erwies sich die 2,4%ige TRIS Konzentration als beste Verdünnerkomponente. Wenn 500 Millionen

motile Spermien inseminiert wurden, bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der Fertilität zwischen dem 2,4% TRIS-Verdünner und Nativsperma. Die Zugabe von Glyzerin zum TRIS-Verdünner führte zu einer Verschlechterung des Besamungsergebnisses. Als Ursache vermuteten die Autoren eine fertilitätschädigende Interaktion zwischen Glyzerin und anderen Bestandteilen des TRIS-Verdünners.

Weitere in der Literatur erwähnte Verdünner zur Flüssigkonservierung von Hengstsaamen sind ein Glukose-Verdünner mit 20% inaktiviertem Pferdeserum (MERKT, 1976), sowie der Glukose-Eidotter-Verdünner nach GÖTZE, 1949 (Rezeptur siehe S. 35), der von GLATZEL et al. (1981) zur Maultierproduktion verwendet wurde.

2.5. Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma

Zur Tiefgefrierkonservierung werden hauptsächlich Glukose-, Laktose-, TRIS-, ÄDTA-, Milchverdünner mit Zusatz von Glyzerin oder Orvus-Es Paste als Kryoprotektivum eingesetzt.

MERKT und KRAUSE (1966) pelletierten nach der Methode von NAGASE und NIWA (1964) Equidensperma. Der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien nach dem Auftauen lag mit 50 bis 70% um 10 bis 20% unter den Werten vor dem Einfrieren des verdünnten Spermas. Als Verdünner wurden Glukose-Eidotter-, Laktose-Eidotter und Raffinose-Eidotter-Verdünner mit Glyzerin getestet. ROMBE und KOTYAGINA (1968) verdünnten Sperma mit folgendem Verdünner: Laktose 11 g, Glyzerin 3,5 ml, Eidotter 0,8 g, Streptomycin 0,125 g, Penicillin 300.000 I.E., aqua dest. 100 ml. Das verdünnte Sperma wurde pelletiert, von 43 besamten Stuten fohten 26. Eine ähnliche Konzeptionsrate (56% von 572 besamten Stuten) erzielte NISHIKAWA (1975) mit einem Glukose-Laktose-Verdünner mit 4 bis 5% Glyzerin.

NAGASE et al. (1966 a) zentrifugierten und resuspendierten Hengstsperma mit einem Glukose-Eidotter-TRIS-Verdüner mit 5,5% Glyzerin. Das verdünnte Sperma wurde in Pelletform eingefroren und Inseminationen bei 7 Stuten durchgeführt; 2 Fohlen wurden geboren. NAGASE et al. (1966 b) untersuchten Glyzerinkonzentrationen und verschiedene Zucker zur Herstellung von Tiefgefrier-Hengstsperma in Pelletform. Die Auftauraten waren bei 3,5% Glyzerin besser als bei 1,75 und 7,0%, Raffinose-Lösung war Sucrose-Lösung überlegen. Für einen Besamungsversuch wurde konzentriertes Sperma mit einem Glukose-Raffinose-Sucrose-Eidotter-Glyzerin-Verdüner verdünnt. Als Auftaumedium diente Magermilch und eine Verdünnerlösung aus Natriumzitat, Natriumkarbonat, Kaliumkarbonat und Glukose, die mit 5,5%iger Zitronensäurelösung auf pH 7,0 eingestellt wurde. Aus 42 Besamungen resultierten 14 Konzeptionen. RAJAMANNAN et al. (1968) verglichen bei Glukose-Magermilch-, Laktose-Magermilch-, Glukose-Eidotter- und Laktose-Eidotter-Verdünnern unterschiedliche Glyzerinkonzentrationen. Optimale Auftauraten des in Ampullen abgefüllten Spermas wurden bei 4%iger Glyzerinkonzentration erreicht. 10 Besamungen führten zu 4 Trächtigkeiten.

Magermilchprotein-TRIS-Verdüner mit 6% Glyzerin verwendeten ELLERY et al. (1971) zur Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma in Glasampullen. Das Sperma wurde 10 Monate in flüssigem Stickstoff aufbewahrt, 7 von 17 Stuten konzipierten.

Eine neue Form der Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma stellt das Abfüllen in Pailletten dar. MARTIN, KLUG und GUNZEL (1979) entwickelten hierfür einen Zweiphasen-Verdüner (Rezeptur siehe S. 36). Für die notwendige Konzentration des Hengstspermas wurde dem Sperma zunächst ein XDTA-haltiger Vorverdünner zugesetzt und das verdünnte Sperma zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das konzentrierte Sperma mit einem XDTA- und laktosehaltigen Kombinationsverdünner (nach NAGASE und NIWA, 1964) resuspendiert, in Kunststoffröhrchen ab-

gefüllt und tiefgefroren. Nach Erstbesamung wurden 12 von 19 besamten Stuten tragend. COCHRAN et al. (1984) veränderten den Zweiphasenverdünner nach MARTIN, KLUG und GONZEL (1979), um die Sedimentation des zentrifugierten Spermas zu verbessern. Sie verwendeten als Vorverdünner zur Zentrifugation des Spermas einen modifizierten Glukose-ADTA-Verdünner mit höherem Natriumzitratgehalt und niedrigerem Glukosegehalt. Bei einem Vergleich beider Methoden differierte die Motilität der Spermien nach dem Auftauen nicht.

Auf die Problematik der Aussagekraft der Motilitätsbeurteilung nach dem Tiefgefrierprozeß weisen die Untersuchungen von ANDERSON et al. (1980) hin. Trotz sehr guter Auftauraten nach dem Tiefgefrieren konnten mit TRIS-verdünntem Sperma (0,349% TRIS, 20% Eidotter, 3,85% Glukose, 0,16% Zitronensäure und Antibiotika) keine Trächtigkeiten erzielt werden.

GUAY et al. (1981) arbeiteten mit einem TRIS-Fruktose-Verdünner und untersuchten vor und nach dem Tiefgefrieren die Wirkung von Glyzerin anhand der Motilität, Lebend-Tot-Färbung mit Eosin und der Aspartat-Aminotransferase-Freisetzung auf pelletierte Hengst spermatozoen. Die Zugabe von Glyzerin unterschiedlicher Konzentrationen (0 bis 5,3%) zum Verdünner hatte keinen negativen Einfluß auf die untersuchten Parameter. Beim Einsatz im Besamungsversuch konzipierten 7 von 17 Stuten bei Verwendung von tiefgefrorenem Samen sowie 7 von 10 bei Insemination mit flüssigkonserviertem Sperma.

2.6. Flüssigkonservierung von Rüdensperma

Zur Flüssigkonservierung von Rüdensperma werden Eidotter-Glukose-Verdünner mit oder ohne Serumzusätze, Milch-, Zitrat-, Phosphat- und TRIS-Verdünner verwendet.

Nach BIEDERMANN (1951) eignen sich Eidotter-Glukose-Verdüner (4% Eidotter und 6 bis 10% Glukose) oder Serum-Glukose-Verdüner. Als Serumzusatz wurde inaktiviertes Hundeserum oder Rinderserum (10 bzw. 50%) verwendet. Die Glukosekonzentration sollte 5,5 bis maximal 7% betragen. Im Glukose-Eidotter-Verdüner betrug die maximale Motilitätsdauer der Spermien bei einer Verdünnung von 1:3-4 und einer Lagerungstemperatur von + 4° C bis zu 72 Stunden, im Hundeserum-Glukose-Verdüner bei 1:4 Verdünnung bis zu 144 Stunden.

An der Darstellung eines Einzelfalles ist die Eignung von pasteurisierter Milch als Samenverdünner beim Rüden belegt (HARROP, 1954). Das Sperma wurde im Verhältnis 1:8 verdünnt und bei + 4° C gelagert. Nach 4 Tagen wurde eine Hündin intrauterin besamt, die nach 64 Tagen welpte. Auch BAHLAU (1958) beobachtete nach Verdünnung mit einem Magermilchpulver-Verdüner (Magermilchpulver 10,0 g, Eidotter 10,0 ml, Aqua dest. 100,0 ml) noch nach 8 Tagen Lagerung bei + 5° C eine Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien) von 45%. SEAGER und FLETCHER (1972) arbeiteten mit dem von THACKER und ALMQUIST (1953) für Bullensperma beschriebenen Magermilch-Verdüner. Das im Verhältnis 1:4 verdünnte Sperma wurde bei + 4° C bis + 8° C im Kühlschrank gelagert. Bei Besamung mit 1-4 Tage gelagertem, verdünnten Sperma wurden 8 von 15 Hündinnen trächtig.

WALES und WHITE (1963) bewahrten verdünntes Rüdensperma 4 Stunden bei + 37° C auf und untersuchten stündlich die Motilität. Die besten Ergebnisse wurden mit einer Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung erzielt. Die Verwendung von Natriumzitrat anstelle von Natriumphosphat als Puffersubstanz führte zu schlechteren Ergebnissen ebenso wie bei einem Zusatz von Pepton zum Verdünner. Im Gegensatz zu WALES und WHITE (1963) erzielten FOOTE und LEONHARD (1964) mit einem Natriumzitrat-Puffer (Rezeptur siehe S. 37) bessere Ergebnisse als mit einem Phosphatpuffer. Nach 13 Tagen Lagerung bei + 5° C waren im Natriumzi-

trat-Verdünner noch 40% motile Spermien vorhanden. Ein gleichzeitig untersuchter Milchverdünner war nicht in der Lage, die Motilität des verdünnten Rüdensamens ähnlich gut zu erhalten.

GILL et al. (1970) setzten einen TRIS-Verdünner (Rezeptur siehe S. 38) zur Flüssigkonservierung und Tiefgefrierkonservierung ein. Nach 24 Stunden Lagerung bei $+ 5^{\circ} \text{C}$ wurde mit dem verdünnten Sperma besamt, die Konzeptionsrate betrug 80%. Mit dem tiefgefrorenen Sperma hingegen konnten trotz guter Motilität nach dem Auftauen keine Trächtigkeiten erzielt werden.

2.7. Tiefgefrierkonservierung von Rüdensperma

Versuche zur Tiefgefrierkonservierung wurden zunächst nur in-vitro durchgeführt, das Tiefgefriersperma wurde nicht im Besamungseinsatz überprüft. BAHLAU (1958) verwendete einen Natriumzitrat-Puffer mit einer Glyzerinkonzentration von 6,5% zur Tiefgefrierkonservierung. Nach der Spermagewinnung wurde der Verdünner dem Sperma im Verhältnis 1:4 sofort zugesetzt, die Proben auf $+ 5^{\circ} \text{C}$ abgekühlt und das in Ampullen aufbewahrte Sperma auf $- 79^{\circ} \text{C}$ eingefroren. Nach dem Auftauen waren bis zu 40% der Spermien vorwärtsbeweglich.

MARTIN (1963 a) verglich einen Magermilchpulver-Verdünner mit einem Ringer-Fruktose-Phosphat-Verdünner und einem Zitrat-Fruktose-Phosphat-Verdünner und stellte fest, daß nach dem Auftauen der Ampullen Motilität und Geschwindigkeit der Spermien im Magermilch-Verdünner mit 8% Glyzerin besser waren. Durch Zugabe von Fruktose, Rinderplasmaalbumin oder Eilecithin ließ sich die Motilität in einem Verdünner aus Ringer-Lösung und Phosphat-Puffer nach dem Auftauen verbessern (MARTIN, 1963 b).

Die erste erfolgreiche Besamung mit Tiefgefriersperma, das mit einem modifizierten Laktose-Eidotter-Verdünner nach NAGASE

und NIWA (1964) verdünnt und anschließend pelletiert worden war, gelang SEAGER, (1969). Der Samen wurde 9 Monate in flüssigem Stickstoff gelagert, in 3%iger Natriumzitratlösung bei + 30° C aufgetaut und eine Hündin intravaginal inseminiert. Aus der Besamung resultierten 2 Welpen. ANDERSEN (1972) besamte 8 Hündinnen intravaginal mit Sperma, das mit Laktose-Eidotter-Verdünner nach NAGASE und GRAHAM (1964) oder TRIS-Verdünner nach DAVIS et al. (1963) verdünnt und pailletiert worden war. Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien betrug bei beiden Verdünnern 40 bis 60%, jedoch wurde keine der Hündinnen trächtig. Bei späteren Versuchen benutzte ANDERSEN (1975) erneut den TRIS-Verdünner nach DAVIS et al. (1963), besamte jedoch diesmal intrauterin. Dabei konzipierten 10 von 11 Hündinnen.

In Untersuchungen von HEIDRICH (1977) mit pelletiertem Sperma war ein TRIS-Verdünner dem Laktose-Eidotter-Verdünner nach SEAGER, 1969 (Rezeptur siehe S. 38) und dem Illinois-Variable-Temperature (IVT)-Verdünner überlegen. Während im Laktose-Eidotter-Verdünner und im IVT-Verdünner die durchschnittliche Spermienvorwärtsbewegung nach dem Auftauen bei 15 und 20% lag, betrug sie im TRIS-Verdünner 40%.

SMITH und GRAHAM (1984) benutzten Piperazin-1-4- bis (2-ethansulfonsäure) (PIPES), N-TRIS (hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethansulfonsäure (TES) und N, N-Bis (2-hydroxymethyl)-2-aminoethansulfonsäure (BES) als Verdünnerkomponenten und stellten den pH mit TRIS, KHCO_3 , K_3PO_4 und KOH auf $7,0 \pm 0,1$ und den osmotischen Druck auf 300 ± 10 mOsm ein. Das Sperma wurde 1:2 verdünnt und pailletiert. Die besten Auftauraten erreichte ein Verdünner bestehend aus PIPES/KOH, Natriumzitrat und Dextrose, dem Eidotter und Glyzerin zugefügt wurden. Nach intrauteriner, chirurgischer Besamung konzipierten 4 von 7 Hündinnen, bei intravaginaler Besamung wurde 1 von 7 Hündinnen trächtig.

2.8. Die extrazelluläre GOT-Aktivität als Indikator für Membranschädigungen der Spermienzelle

Trotz guter Motilität nach dem Auftauen von tiefgefrorenem Sperma wird berichtet, daß nach Insemination keine oder nur vereinzelte Befruchtungen erzielt wurden (Schwein: WILMUT und POLGE, 1971 und 1972; Hund: GILL et al., 1970; ANDERSEN, 1972; Pferd: ANDERSON et al., 1980). Zur Beurteilung des Befruchtungsvermögens wurde deshalb die Schätzung der Bewegungsaktivität durch verschiedene andere Kriterien ergänzt. Besondere Bedeutung erlangten hierbei die Bestimmung der extrazellulären GOT-Aktivität und die morphologische Untersuchung der Akrosomen.

Die Tatsache, daß beim Menschen nach Myokardinfarkten (LADUE et al., 1954; KATTUS, 1956) oder Muskeldystrophien (WHITE und HESS, 1958) ein durch Zellläsion bedingter erhöhter Serum-GOT-Wert festgestellt wurde, legte es nahe, die Bestimmungen des aus den Samenzellen austretenden Enzymanteils als Indikator für Membranschädigungen heranzuziehen. Hierzu bietet sich die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT, auch als Aspartat-Aminotransferase, ASAT, bezeichnet) an. Die GOT wurde sowohl intra- als auch extramitochondrial in den Zellen aller bisher untersuchten tierischen und menschlichen Gewebe gefunden (BERGMEYER, 1970).

Um die extrazelluläre GOT-Aktivität als Indikator für Zellschädigungen zu benutzen, muß sichergestellt sein, daß die GOT-Aktivität primär aus den Zellen, nicht aber aus seminalplasmaeigenen Enzymaktivitäten stammt. Statistisch gesicherte Beziehungen zwischen der Spermiedichte in Bullenejakulaten und der im Seminalplasma gemessenen Enzymaktivität (FLIPSE, 1960; ROUSSEL und STALLCUP, 1965; PACE und GRAHAM, 1970; GRAHAM et al., 1970; BROWN et al., 1971) sowie ein gegenüber den Normalwerten deutlich erhöhter Enzymspiegel im Seminalplasma nach

stärkster Schädigung der Spermien durch Sturzgefrieren in flüssigem Stickstoff (GRAHAM und PACE, 1967; GRAHAM et al., 1970) weisen auf eine primär intrazelluläre Lokalisation der GOT hin.

Daß dieses Enzym aus den Samenzellen stammt, bewiesen PACE und GRAHAM (1970), die in vergleichenden GOT-Bestimmungen im Seminalplasma eines Bullen nach Durchtrennung beider Nebenhodenkörper im spermienfreien Ejakulat nur noch Spuren von GOT-Aktivität feststellten. Auch HERAK et al. (1967) konnten im Seminalplasma von vasektomierten Ebern nur noch Spuren von GOT-Aktivität ermitteln. Beim kastrierten Hengst sinkt der GOT-Gehalt im Ejakulat in Abhängigkeit von der nach der Kastration verstrichenen Zeitdauer (HILLMANN und TREU, 1974).

Der GOT-Gehalt im Seminalplasma ist bei Human-, Hengst- und Bullensperma (RÄTZ und MATTHEUS, 1972; HILLMANN und TREU, 1974; BROWN et al., 1971; GASTAUER, 1974), sowie beim Ebersperma (HERAK et al., 1967; HILLMANN, 1972; HILLMANN und TREU, 1973; BOWER et al., 1973) von der Spermiedichte abhängig.

PURSEL et al. (1969) trennten durch Zentrifugation Samenzellen und Samenplasma des Eberspermas und froren beide Anteile getrennt ein. Nach dem Auftauen erhielten sie aus den Spermien vielfach höhere Enzymaktivitäten als aus Seminalplasmaproben. Diese Beobachtung, sowie eine vermehrte Enzymaktivität im Seminalplasma als Folge einer maximalen Spermenschädigung (GRAHAM und PACE, 1967; HILLMANN und TREU, 1974), und die Feststellung, daß ein Verlust der GOT-Aktivität der Spermien gleichzeitig einen Anstieg der Enzymaktivität im Seminalplasma bewirkte (PURSEL et al., 1970), zeigten, daß die GOT primär aus den Spermien stammt.

HILLMANN und TREU (1974) und KLENNER (1975) zeigten, daß durch den Tiefgefrierprozeß erhöhte GOT-Aktivitäten und vermehrt geschädigte Akrosomen verursacht werden.

Beziehungen zwischen dem extrazellulären GOT-Gehalt und dem Befruchtungsvermögen von Samenproben sind in der Literatur nur vereinzelt erwähnt. So stellten beim Bullen PACE und GRAHAM (1970) signifikante Korrelationen zwischen GOT-Freisetzung und Befruchtungsvermögen fest.

LARSSON et al. (1980) fanden bei Ebern mit reduzierter Fertilität erhöhte GOT-Aktivität im Sperma. Obersteigt die freigesetzte GOT-Aktivität im verdünnten Ebersperma $300 \text{ mU}/10^9$ Spermien, so deutet dies auf einen Alterungsprozeß der Spermien und verminderte Befruchtungsfähigkeit hin (STREZEZEK und SLAWETA, 1984).

2.9. Akrosomalterationen durch Spermakonservierung

Nachdem im Akrosom die für die Befruchtung notwendigen Enzyme lokalisiert sind, ist anzunehmen, daß diese Enzyme bei Alterationen des Akrosoms, wie sie bei der Spermakonservierung verursacht werden können, inaktiviert werden oder verloren gehen. Derart geschädigte Spermien vermindern das Befruchtungsvermögen des verdünnten Spermas bei der künstlichen Besamung.

SAACKE und WHITE (1972) konnten an 156 Ejakulaten von 16 Bullen und 42 028 durchgeführten Erstbesamungen zeigen, daß eine statistisch gesicherte Korrelation zwischen den Befruchtungsergebnissen (Non-return Werte) und dem Anteil an Spermien mit normalem apikalen Rand nach dem Auftauen und 10-stündiger Inkubation des Spermas bei $+ 37^{\circ} \text{ C}$ bestand. Die Autoren kamen zu dem Schluß, daß die quantitative Beurteilung der Akrosomin-tegrität zusammen mit der Motilitätsschätzung und Zählung des Anteiles morphologisch abweichender Samenzellen das beste Kontrollprogramm für das Befruchtungsvermögen bietet. In anderen Untersuchungen (34 Ejakulate von 4 Bullen, 7 297 Besamungen) konnten keine gesicherten Beziehungen zwischen Non-return Er-

gebnissen und Laborbefunden für Motilität und Akrosomintegrität ermittelt werden (PAPA et al., 1982).

Die Ergebnisse von WEITZE(1977 a) über die Tiefgefrierkonservierung von Kaninchensperma lassen die Schlußfolgerung zu, daß für ein ungestörtes Befruchtungsvermögen einer Samenprobe das Vorhandensein einer bestimmten Anzahl an Spermien mit intakter Motilität und Akrosomstruktur notwendig ist. HELLEMANN (1976) bewertete die Aussagefähigkeit des Anteiles nichtgeschädigter Akrosomen beim tiefgefrorenen Kaninchensperma sogar höher als die des Parameters Motilität.

HEALEY (1969) führte elektronenmikroskopische Untersuchungen an Bullen-, Schafbock-, Eber- und Chinchillasperma vor und nach dem Auftauen durch. Das Sperma wurde 1:10 mit einem Natriumzitrat-Eidotter-Verdüner bei Raumtemperatur verdünnt, auf + 5° C abgekühlt und mit dem gleichen Volumen eines 15% bis 20% Glycerin enthaltenden Verdünners nachverdünnt. Nach 5 Stunden Äquilibration wurde das Sperma in Pellets eingefroren. Das Bullen- und Hengstsperma zeigte keine Veränderungen durch das Tiefgefrieren. Beim Schafbocksperma traten fortschreitende Akrosomveränderungen in Form von Akrosomschwellung, Bläschenbildung an der äußeren Plasmamembran bis hin zur Akrosomablösung auf. Starke Schädigungen ließen sich auch am Akrosomkomplex des Eberspermas nachweisen. FAZANO et al. (1982) verglichen Sperma, das mit XDTA-(Merck)-Verdüner und Zorlesco-Verdüner konserviert und bei + 5° C aufbewahrt wurde. Nach 7-tägiger Lagerung waren sowohl Motilität als auch Akrosomintegrität in beiden Verdünnern auf Werte unter 30% abgesunken. Die Autoren folgerten daraus, daß mit beiden Verdünnern eine Verlängerung der Lagerzeit nicht erreicht werden dürfte.

Vergleichende lichtmikroskopische (WATSON und MARTIN, 1972) und elektronenmikroskopische Untersuchungen (WARNAWSKI, 1971; JONES, 1973) ergaben wie die Untersuchungen von HEALEY (1969),

daß die Plasmamembran und das Akrosom von Schafbockspermien unter gleichen Konservierungsbedingungen stärker geschädigt werden als von Bullenspermien. QUINN, WHITE und CLEVELAND (1969), HEALEY (1969) und WARNAWSKI (1971) stellten bereits bei frisch-gewonnenem Schafbocksperma eine losgelöste oder fehlende Plasmamembran im Akrosombereich fest.

Als wesentliche Ursache der Membranabhebungen und Veränderungen bei Schafbockspermien ermittelten MÖLLER et al. (1977) die Verweildauer der Spermien im unverdünnten Seminalplasma neben der Osmolalität der Konservierungsmedien. Bereits innerhalb weniger Minuten nach der Spermagewinnung kam es zu wellenartigen Umbildungen der Plasmamembran und der Akrosomoberfläche, nach 15 Minuten Aufbewahrung bei Zimmertemperatur traten bei 50% der Spermien Schädigungen der äußeren Akrosommembran auf.

Nach NEVES (1980) ist die Untersuchung der Kopfkappenmorphologie für die Beurteilung tiefgefrorenen Schafbockspermias zum Besamungseinsatz unumgänglich, wobei ein Mindestanteil von 50% Samenzellen mit normalem apikalen Rand unbedingt erforderlich zu sein scheint.

BIELANSKI (1975) beobachtete bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Pferdespermien Ausdehnung des Akrosoms, Ablösung und Faltigwerden der äußeren Plasmamembran nach dem Auftauen, sofern der Verdünner kein Glyzerin enthielt. Im glyzerinhaltigen Verdünner hingegen waren die Spermienköpfe im Vergleich zum nichteingefrorenen, verdünnten Kontrollsperma unverändert. Mit dem Lichtmikroskop ließen sich Veränderungen, die bei elektronenmikroskopischer Untersuchung sichtbar wurden, nicht ermitteln. Auch HEALEY (1969) hatte keine Veränderung der Ultrastruktur im Kopfbereich der Spermien nach dem Tiefgefrieren feststellen können. In Untersuchungen von BAUMGARTL (1980) führte die Zentrifugation von Pferdesperma mit oder ohne vorhergehende Verdünnung (XDTA-Merck-Verdünner) zu einem Anstieg

hochgradiger Veränderungen des Akrosoms. Die nach Zentrifugation erhaltenen Befunde waren rechnerisch identisch mit den Ergebnissen nach 3-tägiger Flüssigkonservierung bei + 4° C mit Nagaseverdüner und Tiefgefrierkonservierung (Verdüner nach Nagase, Pelletmethode). Bei einem qualitativen Vergleich der phasenkontrastmikroskopischen und transmissionselektronischen Befunde bezüglich des zuverlässigen Erkennens von Akrosomalalterationen stellt die Autorin fest, daß die Phasenkontrastmikroskopie erst dann akrosomale Veränderungen zuverlässig erkennen läßt, wenn die Breite des Akrosoms mindestens 1000 Å erreicht. Strukturen, die kleiner als 0,1 µm sind, können wegen des begrenzten Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes nicht erkannt werden.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. MATERIAL UND METHODEN

3.1.1. Samenspender

Als Samenspender standen zur Verfügung:

- 2 Eber der Rasse Pietrain und 1 Deutsche Landrasse Eber (Alter 2 - 2,5 Jahre)
- 1 Warmbluthengst (13 Jahre) und 2 Shetlandponyhengste (10 bzw. 12 Jahre)
- 1 Boxerrüde (4 Jahre), 1 Pointerrüde (4 Jahre) und 1 Riesenschnauzerrüde (5 Jahre).

Das Allgemeinbefinden der Tiere war während der Versuchsdauer ungestört; es wurden keine Befunde erhoben, die auf eine Besonderheit der Geschlechtsorgane und -funktionen hingewiesen hätten. Über das Befruchtungsvermögen der Tiere war nichts bekannt.

3.1.2. Spermagewinnung

3.1.2.1. Spermagewinnung beim Eber

Die Spermagewinnung beim Eber wurde mit einer künstlichen Scheide am Phantom durchgeführt. Zur Verarbeitung gelangte lediglich die spermienreiche Hauptphase, das Sekret der Bulbourethraldrüsen (Gel) wurde mit Hilfe einer sterilen Mullbinde abfiltriert. Die Eber wurden regelmäßig 2mal pro Woche im Abstand von 2 - 3 Tagen zur Spermagewinnung herangezogen.

3.1.2.2. Spermagewinnung beim Hengst

Zur Spermagewinnung beim Hengst wurde die künstliche Scheide nach Götze (Fa. Hauptner) verwendet. Das gesamte Ejakulat wurde in dem im Innenschlauch der Scheide eingebundenen Auffangglas gesammelt. Der muköse Teil des Ejakulates wurde nach der Spermagewinnung durch eine doppelte Lage steriler Gaze vom Ejakulat getrennt. Von jedem der Hengste wurden regelmäßig 2mal pro Woche im Abstand von 2 - 3 Tagen Ejakulate gewonnen.

3.1.2.3. Spermagewinnung beim Rüden

Die Desemination der Rüden wurde 2mal wöchentlich vorgenommen. Die Spermagewinnung erfolgte fraktioniert durch Penis-massage. Als zusätzlicher Reiz wurde eine Hündin in Sichtweite des Rüden gebracht. Die spermienreiche Fraktion des Ejakulates wurde in vorgewärmten ($30 - 35^{\circ} \text{C}$), weithalsigen Erlenmeyerkolben aufgefangen.

3.1.3. Spermauntersuchung

3.1.3.1. Untersuchung des unverdünnten Spermas

Unmittelbar nach der Spermagewinnung wurden die Ejakulate nach üblichen andrologischen Kriterien beurteilt. Makroskopisch wurden dabei das Volumen, die Farbe und die Konsistenz bestimmt sowie eventuelle Beimengungen registriert. Mikroskopisch wurde zunächst die Motilität (prozentualer Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien, Anteil ortsbeweglicher Spermien und Anteil pathologischer Bewegungen) untersucht. Bei Ejakulaten von Hengst und Rinde wurde eine Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin zur Objektivierung der Motilitätsschätzung ausgewertet, bei Eberejakulaten wurde der Prozentsatz Spermien mit normalem apikalen Rand (Formolsalzlösung nach HANCOCK, 1956) erfaßt. Die Dichtebestimmung wurde mit einer Zählkammer nach Türck durchgeführt. In allen Ejakulaten wurde der pH-Wert (pH-Meter, Fa. Püsl), der osmotische Druck (Osmometer, Fa. Knauer) und die extrazelluläre GOT-Aktivität (Photometer, Fa. Eppendorf) bestimmt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das Sperma nach der Gewinnung in einem Wasserbad bei $+ 30^{\circ} \text{C}$ bis $+ 32^{\circ} \text{C}$ aufbewahrt.

3.1.3.2. Untersuchung des verdünnten Spermas

3.1.3.2.1. Messung von pH und Osmolalität

Der pH und die Osmolalität wurden - wie in 3.1.3.1. angegeben - gemessen. In glyzerinhaltigen Proben war eine Messung der Osmolalität nicht möglich, da das Gefrierschutzmittel Glyzerin die Gefrierpunktskonstante ändert. Die Osmolalität der glyzerinhaltigen Proben wurde daher vor der Zugabe von Glyzerin bestimmt.

3.1.3.2.2. Bestimmung der Motilität

Unter der Bezeichnung "Motilität" wird im folgenden immer der subjektiv ermittelte Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien in einer Spermaprobe verstanden. Zur Bestimmung der Motilität wurde ein Tropfen Sperma (ca. 0,01 ml) auf einen + 38° C vorgewärmten Objektträger gegeben und bei 400-facher Vergrößerung und Phasenkontrastbeleuchtung die Motilität, d.h. der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien geschätzt.

3.1.3.2.3. Lebend-Tot-Färbung

Die Lebend-Tot-Färbung der Spermien wurde mit Bromphenolblau-Nigrosin nach BONNADONNA und OLGIATI (1953) durchgeführt. Die benötigten Objektträger und die Farblösung wurden auf einem Heiztisch auf + 38° C temperiert. Ein Tropfen Sperma (ca. 0,01 ml) wurde mit einer Kapillarpipette auf einen gereinigten und entfetteten Objektträger gegeben. Daneben wurde ein etwa gleichgroßer Tropfen Bromphenolblau-Nigrosin pipettiert. Sperma und Farbstoff wurden durch vorsichtiges, leichtes Kippen der Kante eines Deckgläschens (18 x 18 mm) miteinander vermischt und ein Ausstrich angefertigt. Nach dem Trocknen des Ausstriches wurde an 300 Spermien der prozentuale Anteil ungefärbter Spermien ermittelt. Nach allgemeiner Auffassung spiegelt dies den Anteil lebender Spermien wieder. Im folgenden wird daher der Anteil "ungefärbter" Spermien als Anteil "lebender" Spermien bezeichnet.

3.1.3.2.4. Quantitative photometrische Bestimmung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT)

Zur photometrischen Bestimmung der extrazellulären GOT-Aktivität im unverdünnten und verdünnten Sperma wurde das UV-GOT-

Monotest-System der Firma Boehringer, Mannheim benutzt (Monotest GOT opt., Best. Nr. 124362). 1 ml der zu untersuchenden Spermaprobe wurde 15 Minuten bei 600 g zentrifugiert und die Aktivität von 0,1 ml des zellfreien Überstandes mit einem Photometer der Firma Eppendorf bestimmt. Zur Standardisierung wurde die GOT-Aktivität von mU/ml auf mU/10⁹ Spermien umgerechnet:

$$\text{mU GOT-Aktivität/10}^9 \text{ Spermien} = \frac{\text{mU GOT-Aktivität/ml}}{\text{Dichte (Mio. Spermien/mm}^3\text{)}}.$$

Zur Präzisionskontrolle wurde Precinorm U (Fa. Boehringer, Mannheim, Best. Nr. 171735) verwendet und nach jeweils 4 Proben, gemäß der Arbeitsanleitung der Fa. Boehringer, eingesetzt. Messungen, die außerhalb des Vertrauensbereiches lagen, wurden wiederholt. Die GOT-Aktivität der eidotterhaltigen Verdünner wurde von den Meßwerten rechnerisch eliminiert. Wegen des geringen Probevolumens beim Hundesperma wurden 0,5 ml statt 1 ml der zu untersuchenden Spermaprobe zentrifugiert. In Vorversuchen ergab sich dabei keine abweichende GOT-Aktivität durch das geringere Volumen.

3.1.3.2.5. Akrosomintegrität

Zur Beurteilung der Akrosomintegrität beim Ebersperma wurde 0,1 ml der Spermaprobe bei Zimmertemperatur (+ 21° C) in 1,5-ml-Reagenzgefäßen (Fa. Eppendorf) mit der Formolsalzlösung nach HANCOCK (1956) je nach Spermadichte im Verhältnis 1:2 bis 1:5 verdünnt. Ein Tropfen dieses Gemisches wurde mit einer Kappillarpipette auf einen gereinigten und entfetteten Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen (18 x 18 mm) abgedeckt. Die mikroskopische Untersuchung erfolgte anschließend mit einem Phasenkontrastmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. Die Beurteilung der Akrosomaliterationen erfolgte nach der von WEITZE

(1977 a) beschriebenen Methode. Dabei wurde unterschieden zwischen Samenzellen mit normalem apikalen Rand (NAR) und geschädigten Akrosomen. Hierzu zählen geschwollener apikaler Rand, Akrosom in Ablösung, abgelöstes Akrosom und deformiertes Akrosom. Jede Spermaprobe wurde anhand von 2 Präparaten mit jeweils 150 Spermien, insgesamt also 300 Spermien, ausgewertet. Danach wurde der Prozentsatz mit NAR bestimmt.

3.1.4. Herstellung der Verdünner

Alle für die Versuchsdurchführung benötigten Verdünner wurden unmittelbar vor der Verwendung hergestellt. Die dazu notwendigen Chemikalien und ihre Bezugsquellen sind in 3.1.11. aufgelistet. Das zur Herstellung der Verdünner benötigte Wasser wurde entsprechend den Verdünnerrezepturen einfach bzw. zweifach destilliert. Vor Versuchsbeginn wurde jeweils der pH und die Osmolalität der Verdünner wie in 3.1.3.1. beschrieben gemessen.

Die in bestimmten Versuchsabschnitten notwendige Veränderung des ursprünglichen pH-Wertes wurde mit 1 N NaOH bzw. 5,5%-iger Zitronensäurelösung durchgeführt. Waren Veränderungen der Osmolalität notwendig, geschah dies durch Zugabe von Aqua dest. bzw. kristallinem NaCl zum Originalverdünner.

Zur Gewinnung des Eidotters, der für die Herstellung bestimmter Verdünner benötigt wurde, wurde jeweils ein Hühnerei aufgeschlagen, das Eiweiß verworfen und der Eidotter mit Hilfe einer Filterpapierscheibe durch vorsichtiges Wenden von der Eihaut und den Hagelschnüren getrennt.

3.1.5. Rezepturen der verwendeten Verdünner

Die bei den einzelnen Verdünnerrezepturen angegebenen Werte bezüglich pH und Osmolalität basieren auf eigenen Messungen. Existieren Angaben in der Literatur, so sind diese zitiert.

3.1.5.1. Verdünner zur Flüssigkonservierung von Ebersperma

- Beltsville-Verdünner (BL-1) nach PURSEL et al. (1971)

Glukose (Monohydrat)	2,90 g
Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat	1,00 g
Natriumbikarbonat	0,20 g
Kaliumchlorid	0,03 g
Dihydrostreptomycinsulfat	0,10 g
Penicillin	100.000 I.E.
Aqua dest.	ad 100,00 ml

pH: 8,1; 302 mOsm/kg

JOHNSON et al. (1982): 309 mOsm/kg

- Kiew-Verdünner nach HAEGER und MÄCKLE (1971)

Glukose (Monohydrat)	6,000 g
Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat	0,375 g
Äthylen-Diamintetraacetat-	
Dinatriumsalz	0,370 g
Natriumbikarbonat	0,120 g
Penicillin	50.000 I.E.
Dihydrostreptomycinsulfat	0,082 mg
Aqua dest.	100 ml

Der Kiew-Verdünner ist im Handel als Verdünnermischung I für Ebersperma erhältlich (Merck Art. 10821)

pH: 6,8; 395 mOsm/kg

HAEGER und MÄCKLE (1971): pH 6,5

FAZANO et al. (1982): 383 mOsm/kg

JOHNSON et al. (1982): 406 mOsm/kg

- Zorlesco-Verdünner nach GOTTARDI (1983)

Glukose, wasserfrei	1,147 g
Athylen-Diamintetraacetat-Dinatriumsalz	0,236 g
Natriumbikarbonat	0,174 g
Tri-Natriumzitat-2-Hydrat	1,132 g
TRIS	0,540 g
Zitronensäure-Monohydrat	0,380 g
Cystein-Hydrochlorid	0,075 g
Bovines Serum Albumin	0,500 g
Neomycinsulfat	0,130 g
Aqua dest.	. 100 ml

pH: 6,7; 271 mOsm/kg

FAZANO et al. (1982): 244 mOsm/kg

3.1.5.2. Verdünner zur Flüssigkonservierung von Hengstsperma

- Magermilchpulver Verdünner nach COOPER und WERT (1975)

Sanalac	2,40 g
Gelatine	0,40 g
Glukose (Monohydrat)	4,90 g
Gentamycinsulfatlösung (50 mg Gentamycinsulfat/ml)	2,00 ml
Natriumbikarbonatlösung 7,5%	2,00 ml
Steriles Wasser zur Injektion	92 ml

pH: 7,0; 366 mOsm/kg

- Dimitropoulos Medium nach VAN DER HOLST (1983)

Lösung I:

Glukose (Monohydrat)	1,20 g
Fruktose	1,20 g
Aqua bidest.	60 ml

Lösung II:

Tri-Natriumzitratt-2-Hydrat	2,00 g
Glycin	0,94 g
Sulfanilamid	0,35 g
Aqua bidest.	100 ml

pH: 7,0; 298 mOsm/kg

Zur Herstellung des Verdünners werden 30 ml der Lösung I, 50 ml der Lösung II und 20 ml Eidotter gemischt. Nach dem Mischen der beiden Lösungen und des Eidotters wird der Verdünner 20 Minuten bei 600 g zentrifugiert. Der Überstand ist das Dimitropoulos Medium.

- Glukose-Eidotter-Verdünner nach GÖTZE (1949)

Glukose (Monohydrat)	6,00 g
Eidotter	2,00 g
Aqua dest.	100 ml

pH: 5,8; 322 mOsm/kg

3.1.5.3. Verdüner zur Tiefgefrierkonservierung von Hengst-sperma

- Laktose-Eidotter-Verdüner nach MERKT und KRAUSE (1966)
(modifizierter Verdüner nach MAGASE und NIWA, 1964)

Laktose (Monohydrat; 11% Lösung w/v)	75 ml
Eidotter	20 ml
Glyzerin	5 ml

pH: 5,8; 364 mOsm/kg

- Zweiphasenverdünner nach MARTIN, KLUG und GONZEL (1979)

Verdüner I:

Glukose (Monohydrat)	6,000 g
Äthylen-Diamintetraacetat-Dinatriumsalz	0,370 g
Tri-Natriumzitat-2-Hydrat	0,375 g
Natriumbikarbonat	0,120 g
Streptomycin	50 mg
Penicillin	50.000 I.E.
Aqua dest.	100 ml

Verdüner II:

Laktose (Monohydrat; 11% Lösung w/v)	50 ml
Verdüner I	25 ml
Eidotter	20 ml
Orvus-Es Paste	0,8 ml
Glyzerin	5 ml

Verdüner I: pH 6,7; 398 mOsm/kg

Verdüner II: pH 6,4; 378 mOsm/kg

- Laktose- α DTA-Verdünner nach NAUMENKOV und ROMANKOVA (1981)

Laktose (Monohydrat)	6,60 g
Mannose	2,10 g
Glukose (Monohydrat)	0,70 g
Natriumzitat-2-Hydrat (37,5%ige Lösung)	0,45 ml
Natriumbikarbonat (4,2%ige Lösung)	0,35 ml
Eidotter	2,50 g
Glyzerin	3,50 ml
Chelat (α thylen-Diamintetraacetat-Dinatriumsalz)	0,15 g
Aqua dest.	100 ml
pH: 6,1; 406 mOsm/kg	

3.1.5.4. Verdünner zur Flüssigkonservierung von Rüdensperma

- Natriumzitat-Verdünner nach FOOTE und LEONHARD (1964)

Tri-Natriumzitat-2-Hydrat	1,16 g
Glycin	0,75 g
Glukose (Monohydrat)	1,00 g
Eidotter	20 ml
Penicillin	100.000 I.E.
Dihydrostreptomycin	100 mg
Aqua bidest.	ad 100 ml

pH: 7,0; 325 mOsm/kg

FOOTE und LEONHARD (1964): pH 6,6

- TRIS-Verdünner nach GILL et al. (1970)

Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	2,40 g
Zitronensäure (Monohydrat)	1,30 g
Fruktose	1,00 g
Eidotter	20 ml
Dihydrostreptomycin	100 mg
Penicillin	100.000 I.E.
Glyzerin	8,8 ml
Aqua dest.	72,2 ml

pH: 7,0; 326 mOsm/kg

3.1.5.5. Verdünner zur Tiefgefrierkonservierung von
Rüdensperma

- Laktose-Eidotter-Verdünner nach SEAGER (1969)

Laktose (Monohydrat)	11 g
Glyzerin	4 ml
Eidotter	20 ml
Aqua dest.	ad 100 ml

pH: 5,9; 405 mOsm/kg

3.1.6. Flüssigkonservierung von Ebersperma -
Versuchsdurchführung

3.1.6.1. Verdünnung und Lagerung des Eberspermas

Unmittelbar nach der Untersuchung des Nativspermas wurde entsprechend den Ergebnissen der Motilitätsschätzung und der Dichtebestimmung das Sperma in Portionen aufgeteilt, die jeweils ca. 2 Mrd. vorwärtsbewegliche Spermien enthielten. Damit enthielt jede untersuchte Spermaprobe eine Spermienzahl, wie

sie der in der Schweinebesamung üblichen Besamungsdosis entspricht. Entsprechend der notwendigen Verdünnung variierte das Volumen der verdünnten Spermaproben zwischen 20 ml und 50 ml. Die durch die Aufteilung eines Ejakulates gebildeten Spermaproben wurden im Verhältnis 1+3 (ein Teil Sperma und drei Teile Verdünner) mit den zu untersuchenden Verdünnern (Beltsville-, Kiew- und Zorlesco-Verdünner) gemischt. Dabei wurde der auf $+ 30^{\circ} \text{C}$ bis $+ 32^{\circ} \text{C}$ im Wasserbad erwärmte Verdünner tropfenweise zugegeben. Die verdünnten Spermaproben wurden in 100-ml-Glasbehältern mit geschliffenem Verschlußstopfen aufbewahrt. Innerhalb von 6 Stunden wurde das Sperma auf eine Temperatur von $+ 15^{\circ} \text{C}$ abgekühlt und bei dieser Temperatur in einem Kühlschrank (Med 336, Fa. Kirsch) 4 Tage gelagert.

3.1.6.2. Parameter der Untersuchung

Als Kriterien für die Eigenschaften der Verdünner wurden folgende Parameter herangezogen: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, extrazelluläre GOT-Aktivität und Akrosomintegrität. Diese Parameter wurden im unverdünnten Samen, unmittelbar nach der Verdünnung sowie nach 48 bzw. 96 Stunden Lagerungsdauer bei $+ 15^{\circ} \text{C}$ bestimmt.

3.1.6.3. Versuchsaufbau

In einem 1. Versuchsabschnitt wurden die Originalrezepturen des Beltsville-, Kiew- und Zorlesco-Verdünners an 12 Ejakulaten (je 4 Ejakulate von 3 Ebern) im split-sample-Verfahren untersucht. In einem zweiten Versuchsabschnitt wurden Verdünner mit veränderten Rezepturen verwendet. Damit sollte der Einfluß des pH-Wertes, der Osmolalität bzw. die Wirkung von BSA abgeklärt werden.

Die Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Ebersperma wurden in den Monaten September 1983 bis Januar 1984 durchgeführt.

3.1.6.3.1. Modifizierung des pH

Extreme Unterschiede des pH im Originalverdünner waren beim Kiew- (pH 6,8) bzw. Beltsville-Verdünner (pH 8,1) gegeben. Um einen eventuellen Einfluß des pH eines Verdünners darstellen zu können, wurden der Kiew-Verdünner auf einen pH von 8,1 eingestellt, der Beltsville-Verdünner auf pH 6,8. Die derart modifizierten Verdünner wurden im split-sample-Verfahren an 4 Ejakulaten eines Ebers untersucht. Die Versuchsdurchführung und Versuchsparameter entsprachen den Bedingungen bei den Originalverdünnern.

3.1.6.3.2. Modifizierung der Osmolalität

In den Originalrezepturen der für die Untersuchungen der Flüssigkonservierung beim Eber ausgewählten Verdünner betrug die Osmolalität beim Kiew-Verdünner 395 mOsm/kg, beim Beltsville-Verdünner 302 mOsm/kg und beim Zorlesco-Verdünner 271 mOsm/kg. Deshalb wurden der Kiew- und Zorlesco-Verdünner ausgewählt und die Werte der Osmolalität auf 271 mOsm/kg beim Kiew- und 395 mOsm/kg beim Zorlesco-Verdünner eingestellt. Diese modifizierten Verdünner wurden wiederum an 4 Ejakulaten eines Ebers entsprechend der Versuchsdurchführung bei den Originalrezepturen untersucht.

3.1.6.3.3. Einfluß eines Zusatzes von BSA

Der Zorlesco-Verdünner enthält im Gegensatz zum Beltsville- und Kiew-Verdünner 0,5% "Bovines Serum Albumin". Dem Beltsville- und Kiew-Verdünner wurden 0,5% BSA zugesetzt und mit dem Zorlesco-Verdünner verglichen.

3.1.7. Flüssigkonservierung von Hengstsperma - Versuchsdurchführung -

3.1.7.1. Verdünnung und Lagerung des Hengstspermas

Es wurden der Glukose-Eidotter-Verdünner nach GÖTZE (1949), der Magermilchverdünner nach COOPER und WERT (1975) sowie das Dimitropoulos Medium nach VAN DER HOLST (1983) untersucht. Nach der Untersuchung des Ejakulates sowie der Entfernung des schleimigen Anteils (Sekret der Samenblasendrüsen) wurde das Ejakulat entsprechend der Zahl der zu untersuchenden Verdünner in Proben mit jeweils 200 Mio. vorwärtsbeweglichen Spermien aufgeteilt. Dies entspricht der für eine Besamung mit flüssigkonserviertem Samen benötigten Spermienzahl. Die auf + 30 bis + 32° C temperierten Verdünner wurden diesen Spermaproben im Verhältnis 1:1 zugegeben. Proben, die mit dem Magermilchverdünner nach COOPER und WERT (1975) verdünnt worden waren, wurden entsprechend den Angaben der Autoren 3 Minuten bei 300 g zentrifugiert, der Oberstand entfernt und das Sediment mit dem ursprünglichen Verdünnervolumen resuspendiert. Die in der Arbeitsanleitung für das Dimitropoulos Medium geforderte Zentrifugation der verdünnten Spermaproben erfolgte bei 1000 g für 20 Minuten. Auch hier wurde der Oberstand entfernt und das Sediment mit dem ursprünglichen Verdünnervolumen resuspendiert. Die Spermaproben wurden in 20 ml fassenden Reagenz- und Zentrifu-

genröhrchen aus Plastik (Fa. Sarstedt) aufbewahrt, innerhalb von 2 Stunden auf $+ 5^{\circ} \text{C}$ in einem KÜhlschrank abgekühlt und 1 Tag gelagert. Die Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Hengstsperma wurden von Januar bis März 1984 durchgeführt.

3.1.7.2. Parameter der Untersuchung

Der Einfluß der Verdünner auf die Vitalität der Spermien wurde anhand des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien, der Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin und der extrazellulären GOT-Aktivität beurteilt. Diese Parameter wurden im unverdünnten Sperma, unmittelbar nach der Verdünnung bzw. Zentrifugation sowie nach 6 und 24 Stunden Lagerungsdauer bei $+ 5^{\circ} \text{C}$ untersucht.

3.1.7.3. Versuchsaufbau

Anhand von 12 Ejakulaten (je 4 Ejakulate von 3 Hengsten) wurden die Originalrezepturen des Glukose-Eidotterverdünners nach GÖTZE (1949), des Magermilchverdünners nach COOPER und WERT (1975) und des Dimitropoulos Mediums nach VAN DER HOLST (1983) untersucht. Anschließend wurden wiederum modifizierte Rezepturen für die Untersuchungen herangezogen. Außerdem wurde am Beispiel des Dimitropoulos Mediums der Einfluß der Zentrifugation untersucht.

3.1.7.3.1. Modifizierung des pH

Der beim originalen Verdünner im sauren Bereich liegende

pH des Glukose-Eidotter-Verdünners nach GÜTZE (pH 5,8) wurde durch Zugabe von 1 N NaOH auf pH 7,0, den Wert des Dimitropoulos Mediums, eingestellt. Das Dimitropoulos Medium wurde durch 5,5%ige Zitronensäurelösung auf einen pH von 5,8 eingestellt. Die modifizierten Verdünnern wurden in gleicher Weise wie die Originalverdünnern an 4 Ejakulaten eines Hengstes untersucht.

3.1.7.3.2. Modifizierung der Osmolalität

Der osmotische Druck des Verdünners nach GÜTZE (322 mOsm/kg) wurde mit Aqua dest. auf den Wert des Dimitropoulos Mediums (298 mOsm/kg) reduziert. Der osmotische Druck des Dimitropoulos Mediums wurde auf den Wert des Verdünners nach Gütze (322 mOsm/kg) erhöht. Auch hier wurden die Untersuchungen im split-sample-Verfahren an 4 Ejakulaten eines Hengstes durchgeführt.

3.1.7.3.3. Zentrifugation

Bei Anwendung der Originalmethode wird das Sperma mit dem Dimitropoulos Medium verdünnt, 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert und das Sediment resuspendiert. Um den Einfluß dieser Noxe abzuklären, wurde in dieser Versuchsreihe ein Teil des Spermas nach der Originalmethode mit dem Dimitropoulos Medium verdünnt und entsprechend behandelt, die Kontrollprobe wurde mit dem Dimitropoulos Medium verdünnt, jedoch nicht zentrifugiert.

3.1.8. Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma - Versuchsdurchführung

3.1.8.1. Verdünnung und Lagerung des Hengstspermas

Es wurden der Laktose-Eidotter-Verdünnern nach MERKT und

KRAUSE (1966), der Zweiphasenverdünner nach MARTIN, KLUG und GONZEL (1979) und der Laktose-ADTA-Verdünner nach NAUMENKOV und ROMANKOVA (1981) untersucht. Bei dem Verfahren nach MARTIN, KLUG und GONZEL (1979) wurden 10 ml des Nativspermas mit 20 ml Verdünner I (siehe S. 36) verdünnt und anschließend 5 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Der Oberstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe abgehebert und das Sediment mit 20 ml Verdünner II resuspendiert. Die nach MERKT und KRAUSE (1966) sowie nach NAUMENKOV und ROMANKOVA (1981) verdünnten Spermaproben (10 ml Sperma und 20 ml Verdünner) wurden dagegen nicht zentrifugiert, da eine entsprechende Verarbeitung von den Autoren nicht gefordert wurde. Je 4 ml des verdünnten Samens wurden in Kunststoffröhrchen ("Makrotüb", Fa. Minitüb) abgefüllt und die Röhrchen beidseits mit einer passenden Metallkugel verschlossen. Die verbleibende Luftblase wurde in die Mitte der Flüssigkeitssäule balanciert und die gefüllten Kunststoffröhrchen in horizontaler Lage auf einem Rost 2 cm über der Oberfläche von flüssigem Stickstoff in einer Plastikwanne eingefroren. Nach 20 Minuten wurden die Röhrchen zur endgültigen Abkühlung in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend in einem Stickstoffcontainer gelagert.

Die gefrorenen Spermaproben in den Kunststoffröhrchen wurden nach 8-tägiger Lagerung in einem Wasserbad 45 Sekunden bei $+ 50^{\circ} \text{C}$ aufgetaut. Nach sorgfältigem Abtrocknen wurde ein Stück des Plastikröhrchens mit der Verschlusskugel abgeschnitten und der Inhalt des Röhrchens in ein Proben- und Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) geleert.

3.1.8.2. Parameter der Untersuchung

Zur Beurteilung der Eigenschaften der verwendeten Verdünner wurden der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, die Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin sowie die Bestim-

mung des extrazellulären GOT-Spiegels herangezogen. Diese Parameter wurden im Nativsperma, nach der Verdünnung bzw. Zentrifugation sowie nach dem Auftauen ermittelt.

3.1.8.3. Versuchsaufbau

In einem ersten Versuchsabschnitt wurden an 12 Ejakulaten (je 4 Ejakulate von 3 Hengsten) die Eigenschaften der 3 erwähnten Verdünner im split-sample-Verfahren untersucht. Danach wurden wiederum modifizierte Verdünner überprüft.

Die Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma wurden von März bis April 1984 durchgeführt.

3.1.8.3.1. Modifizierung des pH

Der pH des Laktose-Eidotter-Verdünners nach MERKT und KRAUSE (pH 5,8) wurde auf den Wert des Verdünners II des Zweiphasenverdünners nach MARTIN, KLÜG und GONZEL (pH 6,4) erhöht. Dieser wiederum wurde durch Zugabe von 5,5%iger Zitronensäurelösung auf pH 5,8 erniedrigt.

Die modifizierten Verdünner wurden im split-sample-Verfahren an 4 Ejakulaten eines Hengstes untersucht.

3.1.8.3.2. Modifizierung der Osmolalität

Der osmotische Druck des Laktose-ADTA-Verdünners nach NAUMENKOV und ROMANKOVA (1981) wurde mit Aqua dest. auf 364 mOsm/kg eingestellt. Der osmotische Druck des Laktose-Eidotter-Verdünners nach MERKT und KRAUSE (1966) wurde mit kristallinem NaCl auf 406 mOsm/kg erhöht. Damit wurden wiederum die Werte

der Osmolalität der beiden Verdünner gegeneinander vertauscht. Auch in diesen Untersuchungen wurden 4 Ejakulate eines Hengstes überprüft.

3.1.8.3.3. Variation des Glyzerinanteils

Der Laktose-Eidotter-Verdünner nach MERKT und KRAUSE (1966) enthält als Originalverdünner 5% Glyzerin. Diese Konzentration wurde mit einer 3,5% Glyzerinkonzentration verglichen, wie sie beim Verdünner nach NAUMENKOV und ROMANKOVA (1981) verwendet wurde.

3.1.9. Flüssigkonservierung von Rüdensperma - Versuchsdurchführung

3.1.9.1. Verdünnung und Lagerung des Rüdenspermas

Nach der Beurteilung der unverdünnten Ejakulate wurde je 1 ml Sperma mit 3 ml Verdünner vermischt. Die Verdünner wurden zuvor in einem Wasserbad auf + 30° C bis + 32° C erwärmt. Die verdünnten Spermaproben wurden in 10-ml-Reagenz- und Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt) in einem Wasserbad innerhalb von 2 Stunden auf + 5° C abgekühlt und in einem Kühlschrank bei dieser Temperatur 1 Tag gelagert.

3.1.9.2. Parameter der Untersuchung

Zur Beurteilung der Eigenschaften der untersuchten Verdünner wurde der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, die Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin und der extrazelluläre GOT-Gehalt herangezogen. Die Untersuchungen erfolgten

unmittelbar vor und nach der Verdünnung sowie nach 6 und 24 Stunden Lagerungsdauer bei + 5° C.

3.1.9.3. Versuchsaufbau

Es wurden der Natriumzitrat-Verdünner nach FOOTE und LEONHARD (1964), der TRIS-Verdünner nach GILL et al. (1970) und der Verdünner nach GILL et al. ohne Glyzerinanteil in den Monaten April bis Mai 1984 untersucht.

Nachdem sowohl der pH als auch die Osmolalität der untersuchten Verdünner fast keine Unterschiede aufwiesen, wurde auf eine Variation dieser Parameter, wie sie in den bisherigen Versuchsabschnitten erfolgte, verzichtet. Stattdessen wurden unterschiedliche Anteile der Puffersubstanzen Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat (Verdünner nach FOOTE und LEONHARD, 1964) bzw. Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (Verdünner nach GILL et al., 1970) untersucht.

3.1.9.3.1. Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat

Der Originalverdünner nach FOOTE und LEONHARD (1964) enthält 1,16 g Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat. Für die Untersuchungen wurde dieser Anteil auf die Hälfte (0,58 g) bzw. das Doppelte (2,32 g) des ursprünglichen Gehaltes variiert. Diese Modifikationen wurden gewählt, weil dadurch noch keine gravierenden Auswirkungen auf pH bzw. Osmolalität gegeben waren.

Die unterschiedlichen Anteile an Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat im Verdünner wurden im split-sample-Verfahren an 4 Ejakulaten eines Rüden überprüft.

3.1.9.3.2. Tris (hydroxymethyl)-aminomethan

Im TRIS-Verdünner nach GILL et al. ohne Glyzerin wurde der Anteil der Puffersubstanz Tris (hydroxymethyl)-aminomethan von 1,8 g, 2,4 g sowie 3,6 g untersucht. Im Originalverdünner sind 2,4 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethan enthalten. Auch hier wurde bei der Variation des TRIS-Anteils darauf geachtet, keine zu starken Veränderungen von pH und Osmolalität gegenüber dem Originalverdünner entstehen zu lassen.

Die Untersuchungen erfolgten an 4 Ejakulaten eines Rüden.

3.1.10. Tiefgefrierkonservierung von Rüdensperma - Versuchsdurchführung

3.1.10.1. Verdünnung und Lagerung des Rüdenspermas

Die Ejakulate wurden nach der Gewinnung und Untersuchung in Proben zu je 1 ml aufgeteilt, diese mit 3 ml Verdünner vermischt und danach in 0,5 ml Pailletten (Fa. Albrecht, Aulendorf) abgefüllt. Die Pailletten wurden anschließend mit PVC-Pulver verschlossen. Das verdünnte Sperma wurde im Wasserbad innerhalb von 2 Stunden auf $+ 5^{\circ} \text{C}$ abgekühlt. Daraufhin wurden die Pailletten 3 Minuten in Stickstoffdampf eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Nach 8 Tagen Lagerung wurden die Pailletten bei $+ 75^{\circ} \text{C}$ im Wasserbad 6 Sekunden aufgetaut.

3.1.10.2. Parameter der Untersuchung

Die verwendeten Verdünner wurden anhand des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien, der Lebend-Tot-Färbung mit Brom-

phenolblau-Nigrosin und der extrazellulären GOT-Aktivität vergleichend untersucht. Die Parameter wurden im Nativsperma, nach der Verdünnung sowie nach dem Auftauen bestimmt.

3.1.10.3. Versuchsaufbau

Zur Untersuchung gelangten der Laktose-Eidotter-Verdüner nach SEAGER (1969) mit einer Glyzerinkonzentration von 4% im Originalverdünner, der gleiche Verdünner mit einer Glyzerinkonzentration von 8% und der TRIS-Verdüner nach GILL et al. (1970). Es wurden 12 Ejakulate von 3 Rüden (4 Ejakulate pro Tier) untersucht. In einer anschließenden Versuchsreihe wurden modifizierte Verdünner untersucht. Die Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung erfolgten in den Monaten Mai bis Juni 1984.

3.1.10.3.1. Modifizierung des pH

Der pH des TRIS-Verdüners nach GILL et al. (pH 7,0) wurde mit 5,5%iger Zitronensäure auf den pH des Laktose-Eidotter-Verdüners nach SEAGER (pH 5,9) eingestellt. Der pH des Laktose-Eidotter-Verdüners nach SEAGER (1969) wurde mit 4%iger NaOH auf pH 7,0 erhöht. Die Auswirkungen des modifizierten pH wurden an 4 Ejakulaten eines Rüden überprüft.

3.1.10.3.2. Modifizierung der Osmolalität

Der osmotische Druck des TRIS-Verdüners nach GILL et al. (1970) wurde mit kristallinem NaCl auf 405 mOsm/kg erhöht. Der osmotische Druck des Laktose-Eidotter-Verdüners nach SEAGER (1969) wurde mit Aqua dest. auf 333 mOsm/kg reduziert. Damit

besaßen die Verdünner die Osmolalität des jeweiligen Vergleichsverdünners. Es wurden 4 Ejakulate eines Rüden untersucht.

3.1.11. Reagenzien und Laborgeräte

Für die Herstellung der Verdünner wurden nachfolgende Substanzen der Fa. Sigma Chemie, Taufkirchen und der Fa. E. Merck, Darmstadt verwendet. Die Bestellnummern sind im Anschluß an die Reagenzien aufgeführt.

Xthylendiamintetraacetat -

Dinatriumsalz	Sigma	ED 2SS
Bovines Serum Albumin	Sigma	A 2153
Cystein-Hydrochlorid	Sigma	C 7880
Dihydrostreptomycinsulfat	Sigma	D 7253
Fruktose	Merck	5321
Gelatine	Merck	4078
Gentamycinsulfatlösung	Sigma	G 7507
Glukose Monohydrat	Merck	8342
Glukose, wasserfrei	Merck	8337
Glycin	Merck	4201
Glyzerin	Merck	4093
Kaliumchlorid	Merck	4936
Laktose	Merck	7656
Mannose	Merck	5984
Natronlauge 1 N	Merck	9137
Natriumbikarbonat	Merck	6323
Neomycinsulfat	Sigma	N 1876
Penicillin	Sigma	PEN-NA
Streptomycinsulfat	Sigma	S 6501
Sulfanilamid	Sigma	S 9251
Tris (hydroxymethyl)-aminomethan	Merck	8382
Tri-Natriumzitratt-2-Hydrat	Merck	6432
Zitronensäure Monohydrat	Merck	244

Zur Herstellung des Zweiphasenverdünners nach MARTIN, KLUG und GÖNZEL (1979) wurde Orvus-Es Paste (Hersteller: Nova Chemical Sales, Inc.; P.O. Box 144, Scituate, Mass. 02066, USA) verwendet.

Der Magermilchpulververdünner nach COOPER und WERT (1975) wurde mit "Sanalac" (Hersteller: Sanna Co. of Madison, Wisconsin, USA) hergestellt. "Sanalac" ist ein sofort lösliches Magermilchpulver und ist in USA in Lebensmittelgeschäften erhältlich. Das Magermilchpulver wurde direkt aus USA bezogen.

Für die GOT-Bestimmungen wurde das UV-GOT-Monotest-System der Fa. Boehringer, Mannheim (Monotest GOT opt., Bestellnummer 124362) und Precinorm U (Bestellnummer 171735) verwendet.

Zur Flüssigkonservierung von Ebersperma wurden die Proben in Glasbehältern mit geschliffenem Verschlußstopfen (100 ml Enghals-Standflaschen, Fa. Wagner und Munz) aufbewahrt.

Die flüssigkonservierten Hengstspermaproben wurden in 20 ml fassenden Reagenz- und Zentrifugenröhrchen aus Plastik (Fa. Sarstedt, Art. 55.465) gelagert.

Die Lagerung des flüssigkonservierten Rüdenspermas erfolgte in 10 ml Reagenz- und Zentrifugenröhrchen (Fa. Sarstedt, Art. 55.494).

Das tiefgefrorene Hengstsperma wurde in "Makrotüb" Kunststoffröhrchen (Fa. Minitüb, Landshut) aufbewahrt.

Die 0,5 ml Pailletten zur Tiefgefrierkonservierung von Rüdensperma wurden von der Fa. Albrecht, Aulendorf bezogen.

3.1.12. Statistische Methoden

Zur statistischen Auswertung wurden der U-Test nach Mann-Whitney (-Wilcoxon) sowie der H-Test von Kruskal und Wallis (SIEGEL, 1976) verwendet.

3.2. ERGEBNISSE

3.2.1. Flüssigkonservierung von Ebersperma

3.2.1.1. Untersuchungen mit den Originalrezepturen des Beltsville-, Kiew- und Zorlesco-Verdünnern

Die für die Untersuchungen zur Flüssigkonservierung verwendeten Eberejakulate (3 Eber, je 4 Ejakulate) wiesen alle ein physiologisches Spermabild auf. Die Werte der für die weiteren Untersuchungen zur Flüssigkonservierung ausgewählten Parameter im unverdünnten Samen sind in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Ausgewählte Parameter im unverdünnten Ebersperma für die Untersuchungen zur Flüssigkonservierung (3 Eber, je 4 Ejakulate; $\bar{x} \pm s$)

Eber	pH	Osmolalität (mOsm/kg)	vorwärtsbe- wegliche Spermien (%)	NAR ⁺ (%)	GOT-Aktivität (mU/10 ⁹ Spermien)
A	7,4 $\pm 0,1$	304 $\pm 7,0$	86 $\pm 4,8$	97 $\pm 0,5$	66 $\pm 20,9$
B	7,5 $\pm 0,1$	302 $\pm 5,3$	81 $\pm 8,5$	97 $\pm 1,3$	40 $\pm 7,6$
C	7,7 $\pm 0,2$	306 $\pm 4,4$	78 $\pm 5,0$	96 $\pm 0,6$	42 $\pm 8,9$

⁺Prozent Spermien mit normalem apikalen Rand (NAR)

Nach der Herstellung der Verdünner wiesen der Beltsville-, Kiew- bzw. Zorlesco-Verdünner einen pH von 8,1, 6,8 bzw. 6,7 auf. Wurden die Verdünner bei + 15° C 4 Tage in einem verschlossenen Glasgefäß gelagert, stieg der pH auf 8,6, 7,4 bzw. 7,0.

Nach der Verdünnung (1+3) wiesen alle verdünnten Spermaproben einen pH auf, der ähnlich bzw. identisch mit dem des Verdünners war (siehe Tab. 2). Im Verlauf der 4-tägigen Lagerung war in allen verdünnten Spermaproben ein Abfall des pH-Wertes zu beobachten, der beim Beltsville-Verdünner weitaus am stärksten war.

Tab. 2: pH der verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung sowie nach 48 und 96 Stunden Lagerungsdauer bei + 15° C (Mittelwerte aus je 12 Ejakulaten)

Lagerungszeit Stunden	Beltsville	Verdünnern Kiew	Zorlesco
0	8,1	7,0	6,8
48	7,7	6,8	6,8
96	7,4	6,7	6,6

Die Osmolalität der verwendeten Verdünnern betrug 302 mOsm/kg (Beltsville-Verdünnern), 395 mOsm/kg beim Kiew-Verdünnern und 271 mOsm/kg (Zorlesco-Verdünnern). Nach der Verdünnung im Verhältnis 1 Teil Sperma und 3 Teile Verdünnern wurden Werte von 302 mOsm/kg beim Beltsville-verdünnten Sperma, 375 mOsm/kg beim Kiew-verdünnten Sperma sowie 277 mOsm/kg beim Zorlesco-verdünnten Sperma ermittelt (Mittelwerte aus 12 Ejakulaten).

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien war bei allen 3 Verdünnern nach der Verdünnung fast gleich (siehe Tab. 3). Nach 48 Stunden war ein deutlicher Abfall der Motilität festzustellen, der beim Beltsville-Verdünnern am stärksten war (Differenz zum Kiew- und Zorlesco-Verdünnern $p \leq 0,01$; U-Test). Diese Tendenz war auch nach 96 Stunden Lagerungsdauer zu beobachten.

Tab. 3: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien der verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung sowie nach 48 und 96 Stunden Lagerungsdauer bei + 15° C ($\bar{x} \pm s$; n = 12)

Lagerungszeit Stunden	Beltsville	Verdüner Kiew	Zorlesco
0	75 $\pm$ 7	76 $\pm$ 7	78 $\pm$ 5
48	29 ^a $\pm$ 7	42 ^b $\pm$ 5	50 ^c $\pm$ 7
96	12 ^a $\pm$ 5	27 ^b $\pm$ 6	35 ^c $\pm$ 7

Durchschnittswerte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b, c) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

Der Prozentsatz von Spermien mit normalem apikalen Rand war unmittelbar nach der Verdünnung nahezu genauso hoch wie im unverdünnten Samen (siehe Tab. 1 und 4); der Anteil der Spermien mit intaktem apikalen Rand lag bei 96%, 96% (Beltsville-, Kiew-Verdüner) bzw. 94% (Zorlesco-Verdüner).

Tab. 4: Prozentsatz der Spermien mit normalem apikalen Rand im verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung sowie nach 48 und 96 Stunden Lagerungsdauer bei + 15° C ($\bar{x} \pm s$; n = 12)

Lagerungszeit Stunden	Beltsville	Verdüner Kiew	Zorlesco
0	96 ^a $\pm$ 2	96 ^a $\pm$ 2	94 ^b $\pm$ 1
48	74 ^a $\pm$ 3	79 ^b $\pm$ 2	68 ^c $\pm$ 3
96	48 ^a $\pm$ 3	57 ^b $\pm$ 4	41 ^c $\pm$ 3

Durchschnittswerte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b, c) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

Nach 96 Stunden wiesen im Kiew-Verdüner noch 57% der Spermien ein intaktes Akrosom auf gegenüber 48 bzw. 41% im Beltsville- bzw. Zorlesco-Verdüner (Differenzen zwischen den Verdünnern jeweils $p \leq 0,01$; U-Test).

Die extrazelluläre GOT-Aktivität war unmittelbar nach der Verdünnung in den verdünnten Spermaproben beim Zorlesco-Verdüner am höchsten, zwischen Beltsville- und Kiew-Verdüner bestanden keine signifikanten Unterschiede (Differenzen zwischen Kiew- und Beltsville- bzw. Zorlesco-Verdüner $p \leq 0,01$; U-Test). Dies war bei generell ansteigenden GOT-Werten nach 48 Stunden als auch nach 96 Stunden weiterhin zu beobachten (Tab. 5).

Tab. 5: Extrazelluläre GOT-Aktivität ($\text{mU}/10^9$ Spermien) der verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung sowie nach 48 und 96 Stunden Lagerungsdauer bei $+15^\circ \text{C}$ ($\bar{x} \pm s$; $n=12$)

Lagerungszeit Stunden	Beltsville	Verdüner Kiew	Zorlesco
0	$62^a \pm 18,9$	$48^a \pm 10,5$	$92^b \pm 30,6$
48	$132^a \pm 37,8$	$97^a \pm 31,2$	$159^b \pm 43,0$
96	$163^a \pm 44,7$	$124^a \pm 36,7$	$200^b \pm 54,0$

Durchschnittswerte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

3.2.1.2. Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen

3.2.1.2.1. Modifizierung des pH

Für diese Untersuchungen wurde der pH des Beltsville-Verdüners von 8,1 auf 6,8 gesenkt. Der pH des Kiew-Verdüners

wurde von 6,8 auf 8,1 angehoben. Die Osmolalität der oben genannten modifizierten Verdünner stieg durch die Einstellung des pH geringfügig von 302 auf 308 mOsm/kg (Beltsville-Verdünner) sowie von 395 auf 401 mOsm/kg (Kiew-Verdünner).

Im Laufe einer Aufbewahrung über 96 Stunden bei + 15° C stieg der pH der modifizierten Verdünner auf 7,0 bzw. 8,3. Wurde der Ebersamen mit den im pH-Wert modifizierten Verdünnern im Verhältnis 1+3 verdünnt, ergab sich ein pH von 6,7 (Beltsville) sowie 7,9 (Kiew). Im Verlauf einer 96-stündigen Lagerung sank der pH auf 6,2 (Beltsville) bzw. 7,2 (Kiew). Gegenüber den Originalrezepturen wurde damit ein etwas niedrigerer pH-Wert nach 96 Stunden Lagerung erreicht.

Der Einfluß der pH-Veränderung im Beltsville- und Kiew-Verdünner ist in Tab. 6 dargestellt. Gegenüber den Versuchen unter Verwendung der Originalrezepturen dieser Verdünner ergaben sich ähnliche Werte bei den untersuchten Parametern. Allein der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien war im modifizierten Beltsville-Verdünner (pH 6,8) soweit verbessert, daß ein Unterschied zum modifizierten Kiew-Verdünner (pH 8,1) nicht mehr beobachtet werden konnte.

Tab. 6: Auswirkungen einer Veränderung des pH des Beltsville- bzw. Kiew-Verdünnern auf Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Akrosomintegrität (NAR) sowie extrazelluläre GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; n = 4)

Parameter	Lagerungszeit Stunden	Verdünnern	
		Beltsville	Kiew
Motilität (%)	0	70 $\pm$ 0	70 $\pm$ 0
	48	33 $\pm$ 6	35 $\pm$ 4
	96	24 $\pm$ 5	26 $\pm$ 5
NAR (%)	0	92 $\pm$ 2	93 $\pm$ 1
	48	69 ^a $\pm$ 4	78 ^b $\pm$ 2
	96	47 ^a $\pm$ 3	56 ^b $\pm$ 4
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	53 $\pm$ 12,2	44 $\pm$ 8,1
	48	100 ^a $\pm$ 12,0	70 ^b $\pm$ 13,8
	96	120 ^a $\pm$ 8,7	91 ^b $\pm$ 17,1

Durchschnittswerte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

3.2.1.2.2. Modifizierung der Osmolalität

In dieser Versuchsreihe wurde ein Kiew-Verdünnern mit 271 mOsm/kg sowie ein Zorlesco-Verdünnern mit 395 mOsm/kg verwendet (original 395 mOsm/kg Kiew-Verdünnern; 271 mOsm/kg Zorlesco-Verdünnern). Während der pH-Wert des Zorlesco-Verdünnern dadurch nicht verändert wurde, wies der modifizierte Kiew-Verdünnern einen leicht erniedrigten pH-Wert auf (pH 6,6 gegenüber pH 6,8 beim originalen Kiew-Verdünnern). In den verdünnten Spermaproben

wurden im Vergleich zu den Originalrezepturen sowohl nach der Verdünnung als auch nach 4 Tagen Lagerung etwas niedrigere pH-Werte gemessen (pH 6,3 bzw. pH 6,4 beim modifizierten Kiew- bzw. modifizierten Zorlesco-Verdüner).

Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, Akrosomintegrität und extrazelluläre GOT- Aktivität wurden nach Veränderung des osmotischen Druckes unterschiedlich beeinflusst (Tab. 7). Der Abfall der Motilität im Verlauf der 4-tägigen Lagerung war ähnlich den Ergebnissen bei den Originalverdünnern. Dagegen bewirkte die Konservierung im modifizierten hypotonen Kiew-Verdüner sowohl einen größeren Anteil akrosom-geschädigter Spermien als auch eine erhöhte extrazelluläre GOT-Freisetzung. Bezüglich dieser beiden Parameter war jetzt der Zorlesco-Verdüner dem Kiew-Verdüner überlegen (Differenz $p \leq 0,05$; U-Test).

Tab. 7: Auswirkungen einer Veränderung der Osmolalität des Kiew- bzw. Zorlesco-Verdüners auf Motilität (Prozent vorwärtsbewegliche Spermien), Akrosomintegrität (NAR) sowie extrazelluläre GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; $n = 4$)

Parameter	Lagerungszeit Stunden	Verdüner	
		Kiew	Zorlesco
Motilität (%)	0	70 ± 0	75 ± 4
	48	33 ± 5	41 ± 3
	96	24 ± 5	31 ± 3
NAR (%)	0	89 ± 3	93 ± 1
	48	$57^a \pm 6$	$77^b \pm 3$
	96	$41^a \pm 3$	$54^b \pm 4$
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	$53^a \pm 4,0$	$39^b \pm 7,4$
	48	$123^a \pm 21,8$	$83^b \pm 16,0$
	96	$142^a \pm 17,3$	$99^b \pm 15,8$

Durchschnittswerte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

3.2.1.2.3. Einfluß einer Zugabe von BSA zum Beltsville- und Kiew-Verdünnern

Die Zugabe von 0,5% BSA zum Beltsville- und Kiew-Verdünnern veränderte weder deren pH-Wert noch die Osmolalität. Im Vergleich zu den Ergebnissen mit den Originalrezepturen des Beltsville- und Kiew-Verdünners stieg der pH-Wert bei Lagerung der Verdünnern über 96 Stunden bei + 15° C weniger stark an (pH 8,4 bzw. 7,0). Unmittelbar nach der Verdünnung wurde ein pH von 8,2, 7,1 bzw. 6,8 (modifizierter Beltsville-, modifizierter Kiew-, original Zorlesco-Verdünnern) gemessen. Im Verlauf der 96-stündigen Lagerung fiel der pH auf 7,7, 6,9 bzw. 6,6. Dies entspricht im Falle des Zorlesco-Verdünners den Ergebnissen der vorhergehenden Versuchsreihe. In den durch Zusatz von 0,5% BSA modifizierten Verdünnern Beltsville und Kiew war dagegen der pH-Abfall weniger stark als bei Verwendung der Originalrezepturen ohne BSA (siehe Tab. 2).

Der Zusatz von 0,5% BSA zum Beltsville- und Kiew-Verdünnern ergab keine deutlichen Veränderungen ihrer Konservierungseigenschaften im Vergleich zum Zorlesco-Verdünnern, gemessen am GDT-Wert sowie der Akrosomintegrität (siehe Tab. 8). Die vorher signifikanten Unterschiede der Motilität nach 48 und 96 Stunden Konservierung waren jetzt nur noch nach 96 Stunden zwischen Beltsville- und Kiew-Verdünnern zu beobachten (26% bzw. 35%; Differenz $p \leq 0,05$; U-Test).

Tab. 8: Einfluß eines Zusatzes von 0,5% BSA zum Beltsville- und Kiew-Verdünner auf Motilität (vorwärtsbewegliche Spermien), Akrosomintegrität (NAR) sowie extrazelluläre GOT-Aktivität im Vergleich zum originalen Zorlesco-Verdünner ($\bar{x} \pm s$; n = 4)

Parameter	Lagerungszeit Stunden	Verdünner		
		Beltsville	Kiew	Zorlesco
Motilität (%)	0	75 $\pm$ 6	73 $\pm$ 5	78 $\pm$ 5
	48	36 $\pm$ 5	46 $\pm$ 5	45 $\pm$ 6
	96	26 ^a $\pm$ 3	35 ^b $\pm$ 4	33 ^b $\pm$ 3
NAR (%)	0	93 $\pm$ 1	93 $\pm$ 1	92 $\pm$ 1
	48	70 ^a $\pm$ 3	79 ^b $\pm$ 3	65 ^a $\pm$ 3
	96	46 ^a $\pm$ 2	60 ^b $\pm$ 5	39 ^c $\pm$ 3
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	47 $\pm$ 9,1	44 $\pm$ 7,6	62 $\pm$ 15,7
	48	96 ^a $\pm$ 5,8	75 ^b $\pm$ 6,4	120 ^c $\pm$ 3,9
	96	119 ^a $\pm$ 4,2	96 ^b $\pm$ 1,9	159 ^c $\pm$ 5,0

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b, c) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

3.2.2. Flüssigkonservierung von Hengstsperma

3.2.2.1. Untersuchungen mit den Originalrezepturen des Glukose-Eidotter-Verdünnern nach GÜTZE (1949), des Magermilchverdünners nach COOPER und WERT (1975) sowie des Dimitropoulos Mediums nach VAN DER HOLST (1983)

Die für die Untersuchungen zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierung gewonnenen, unverdünnten Hengstejakulate erfüllten alle die in der andrologischen Praxis üblichen Mindestanforderungen für Hengstsamen. Die Parameter, die für die Beurteilung der Konservierungseigenschaften der Verdünner benutzt wurden, sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9: Ausgewählte Parameter im unverdünnten Hengstsperma zur Beurteilung für die Untersuchungen zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierung (3 Hengste, je 8 Ejakulate; $\bar{x} \pm s$)

Hengst	pH	Osmolalität (mOsm/kg)	vorwärtsbe- wegliche Spermien (%)	lebende Spermien (%)	GOT-Aktivität (mU/10 ⁶ Spermien)
A	7,4 $\pm 0,2$	302 $\pm 6,9$	61 $\pm 3,5$	84 $\pm 6,3$	355 $\pm 26,5$
B	7,4 $\pm 0,2$	301 $\pm 5,2$	68 $\pm 7,1$	80 $\pm 7,5$	265 $\pm 34,8$
C	7,5 $\pm 0,1$	300 $\pm 2,7$	50 $\pm 5,4$	64 $\pm 6,6$	129 $\pm 17,1$

Der pH des Glukose-Eidotter-Verdünners nach GÖTZE (1949) lag unmittelbar nach der Herstellung bei 5,8, der pH des Magermilchverdünners nach COOPER und WERT (1975) betrug ebenso wie der des Dimitropoulos Mediums nach VAN DER HOLST (1983) 7,0.

Während einer 24-stündigen Lagerung bei + 5° C sank der pH des Glukose-Eidotter-Verdünners auf 5,7, der pH des Magermilchverdünners stieg auf 7,4, der pH des Dimitropoulos Mediums blieb unverändert (Mittelwerte aus 12 Verdünnerproben). Nach der Verdünnung (1+1) wurden beim Glukose-Eidotter- als auch beim Magermilchverdünner pH-Werte von 7,1 und beim Dimitropoulos Medium ein pH von 7,0 gemessen. Während der 24-stündigen Lagerung bei + 5° C änderte sich der pH der verdünnten Spermaproben weder im Glukose-Eidotter-Verdünnern, noch im Dimitropoulos Medium. Im Magermilchverdünner stieg der pH dagegen auf 7,3.

Die Osmolalität der verwendeten Verdünner betrug 322 mOsm/kg (Glukose-Eidotter-Verdünnern), 366 mOsm/kg (Magermilchverdünner) und 298 mOsm/kg (Dimitropoulos Medium). Nach der Verdünnung im Verhältnis 1 Teil Sperma und ein Teil Verdünner betrugen die entsprechenden Werte 309 mOsm/kg, 330 mOsm/kg und

301 mOsm/kg (Mittelwerte aus 12 Ejakulaten).

Nach der Verdünnung traten bezüglich des Parameters Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien) keine Unterschiede zwischen den Verdünnern auf (siehe Tab. 10). Im Verlauf der 24-stündigen Aufbewahrungsdauer bei einer Temperatur von + 5° C kam es zu einem unterschiedlich starken Abfall der Motilität. Spermaproben, die mit dem Dimitropoulos Medium verdünnt worden waren, wiesen nach 24 Stunden die beste Motilität (40%) auf, gefolgt vom Magermilch- sowie dem Glukose-Eidotter-Verdüner (22% bzw. 9%; alle Differenzen $p \leq 0,01$; U-Test). Dagegen wurde der mit Hilfe der Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung ermittelte Prozentsatz lebender Spermien im Laufe der Flüssigkonservierung nur geringgradig und ohne signifikante Unterschiede zwischen den Verdünnern reduziert.

Die extrazelluläre GOT-Aktivität konnte in mit Magermilch-verdüner behandelten Spermaproben wegen bereits im Verdüner erheblich schwankenden Extinktionsdifferenzen nicht bestimmt werden. Spermaproben, die mit dem Glukose-Eidotter-Verdüner bzw. dem Dimitropoulos Medium verdünnt worden waren, wiesen zu keinem Zeitpunkt der Untersuchungen (0, 6 und 24 Stunden) signifikante Differenzen bezüglich dieses Parameters auf (Tab. 10).

Tab. 10: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, Prozentsatz lebender Spermien sowie extrazelluläre GOT-Aktivität in verdünnten Spermaproben ($\bar{x} \pm s$; 3 Hengste, je 4 Ejakulate)

Parameter	Lagerungszeit Stunden	Glukose- Eidotter	Verdünner Magermilch	Dimitro- poulos
Motilität (%) -	0	60 $\pm$ 7	60 $\pm$ 7	62 $\pm$ 7
	6	38 ^a $\pm$ 7	44 ^a $\pm$ 5	54 ^b $\pm$ 5
	24	9 ^a $\pm$ 4	22 ^b $\pm$ 7	40 ^c $\pm$ 7
lebende Spermien (%)	0	75 $\pm$ 11	75 $\pm$ 11	76 $\pm$ 11
	6	73 $\pm$ 11	72 $\pm$ 11	74 $\pm$ 10
	24	66 $\pm$ 11	66 $\pm$ 10	69 $\pm$ 9
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	257 $\pm$ 104,5	-	277 $\pm$ 98,8
	6	327 $\pm$ 112,3	-	305 $\pm$ 102,3
	24	392 $\pm$ 134,0	-	355 $\pm$ 124,5

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b, c) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

3.2.2.2. Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen

3.2.2.2.1. Modifizierung des pH

In dieser Versuchsreihe wurde der pH des Glukose-Eidotter-Verdünnerns von 5,8 auf 7,0 angehoben; gleichzeitig wurde der pH des Dimitropoulos Mediums von 7,0 auf 5,8 gesenkt und beide modifizierten Verdünner miteinander verglichen. Die Osmolalität der oben genannten modifizierten Verdünner veränderte sich nach Einstellung des pH im Vergleich zu den Originalverdünnern von 309 auf 316 mOsm/kg (Glukose-Eidotter-Verdünner) sowie von 301 auf 312 mOsm/kg (Dimitropoulos Medium). Wurden die Verdünner bei + 5° C 24 Stunden aufbewahrt, änderte sich der pH des Glukose-Eidotter-Verdünnerns (pH 7,0) sowie der pH des Dimitropoulos

Mediums (pH 5,8) nicht (Mittelwerte aus 4 Verdünnerproben). Nachdem der Hengstsamen im Verhältnis von 1+1 mit den im pH modifizierten Verdünnern gemischt worden war, wurden pH-Werte von 7,0 (Glukose-Eidotter-Verdünner) und 5,8 (Dimitropoulos Medium) gemessen, die während der gesamten Lagerungsdauer von 24 Stunden konstant blieben. Der Einfluß der pH Veränderung des Glukose-Eidotter-Verdünners und des Dimitropoulos Mediums auf Motilität, Prozentsatz lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität ist in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11: Auswirkungen einer Veränderung des pH des Glukose-Eidotter-Verdünners bzw. Dimitropoulos Mediums auf Motilität (Prozent vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; n = 4)

Parameter	Lagerungszeit Stunden	Verdünner	
		Glukose-Eidotter	Dimitropoulos
Motilität (%)	0	60 $\pm$ 0	60 $\pm$ 0
	6	44 ^a $\pm$ 5	10 ^b $\pm$ 7
	24	11 ^a $\pm$ 5	0 ^b
lebende Spermien (%)	0	71 $\pm$ 3	67 $\pm$ 5
	6	68 $\pm$ 2	65 $\pm$ 4
	24	62 $\pm$ 5	60 $\pm$ 4
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	395 $\pm$ 25,9	421 $\pm$ 21,1
	6	421 $\pm$ 49,2	454 $\pm$ 21,5
	24	521 $\pm$ 39,3	534 $\pm$ 43,2

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

Gegenüber den Versuchen unter Verwendung der Originalrezepturen dieser Verdünnern ergaben sich mit Ausnahme der Motilität im modifizierten Dimitropoulos Medium ähnliche Werte bei den

untersuchten Parametern. Während im originalen Dimitropoulos Medium (pH 7,0) die Motilität verhältnismäßig gering beeinflusst wurde (von 62% auf 40%), fiel in mit dem modifizierten Dimitropoulos Medium (pH 5,8) verdünnten Spermaproben die Motilität bereits nach 6 Stunden auf 10% ab. Nach 24-stündiger Konservierung konnten in keinem Fall motile Spermien beobachtet werden. Beim modifizierten Glukose-Eidotter-Verdüner hingegen wurden im Vergleich zum Original-Verdüner (Tab. 10) nach 6 und 24 Stunden ähnliche Motilitätsraten ermittelt. Die Differenzen der modifizierten Verdünner bezüglich der Motilität nach 6 und 24 Stunden Aufbewahrung bei + 5° C waren signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test).

3.2.2.2.2. Modifizierung der Osmolalität

Der osmotische Druck des Glukose-Eidotter-Verdüners wurde in dieser Versuchsreihe von 322 auf 298 mOsm/kg gesenkt und beim Dimitropoulos Medium von 298 auf 322 mOsm/kg erhöht. Der pH der modifizierten Verdünner (Glukose-Eidotter-Verdüner pH 5,8; Dimitropoulos Medium pH 7,0) änderte sich durch die Variation der Osmolalität nicht und blieb auch bei Aufbewahrung bei + 5° C bis zu 24 Stunden konstant. Die Auswirkungen einer Veränderung der Osmolalität sind in Tab. 12 zusammengefaßt.

Im Vergleich zu den Versuchen mit den Originalverdünnern (Tab. 10) wurden nach der Modifizierung der Osmolalität ähnliche Werte bei den untersuchten Parametern ermittelt. Lediglich die Motilität im modifizierten Glukose-Eidotter-Verdüner zeigte erst nach 24 Stunden Lagerung bei + 5° C signifikante Differenzen zum modifizierten Dimitropoulos Medium (9% bzw. 33% vorwärtsbewegliche Spermien; $p \leq 0,05$; U-Test).

Tab. 12: Auswirkungen einer Veränderung der Osmolalität des Glukose-Eidotter-Verdünners bzw. Dimitropoulos Medium auf Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; n = 4)

Parameter	Lagerungszeit Stunden	Verdünnern	
		Glukose-Eidotter	Dimitropoulos
Motilität (%)	0	63 $\pm$ 5	63 $\pm$ 5
	6	43 $\pm$ 5	53 $\pm$ 5
	24	9 ^a $\pm$ 3	33 ^b $\pm$ 5
lebende Spermien (%)	0	71 $\pm$ 6	72 $\pm$ 5
	6	69 $\pm$ 7	71 $\pm$ 5
	24	64 $\pm$ 7	65 $\pm$ 7
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	407 $\pm$ 31,9	426 $\pm$ 29,1
	6	463 $\pm$ 36,4	447 $\pm$ 27,6
	24	547 $\pm$ 54,6	516 $\pm$ 47,7

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

3.2.2.2.3. Zentrifugation

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluß der Zentrifugation auf verdünntes Hengstsperma untersucht. Die Ejakulate wurden hierzu aufgeteilt und ein Teil nach der Originalmethode mit dem Dimitropoulos Medium verdünnt, 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Sediment mit dem Dimitropoulos Medium resuspendiert. Der zweite Teil des Ejakulates wurde mit dem Dimitropoulos Medium verdünnt, das verdünnte Sperma wurde jedoch nicht zentrifugiert. Beide Aufbereitungsverfahren mit dem Dimitropoulos Medium wurden im split-sample-Verfahren verglichen (Tab. 13).

Nach der Verdünnung bzw. Zentrifugation war der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien bei beiden Aufbereitungsver-

fahren gleich (65% vorwärtsbewegliche Spermien). Nach 6 Stunden waren bei der Originalmethode mit Zentrifugation des verdünnten Spermas signifikant mehr vorwärtsbewegliche Spermien als bei der Vergleichsmethode ohne Zentrifugation vorhanden (55 bzw. 38%; Differenz $p \leq 0,05$; U-Test). Diese Tendenz zeigte sich auch nach 24 Stunden Lagerung bei $+ 5^{\circ} \text{C}$ (43 bzw. 13% vorwärtsbewegliche Spermien). Der Prozentsatz lebender Spermien blieb von der Aufbereitungsmethode unbeeinflusst, er nahm während der 24 Stunden Lagerung nur geringfügig ab.

Tab. 13: Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität bei verschiedenen Aufbereitungsverfahren mit dem Dimitropoulos Medium ($\bar{x} \pm s$; $n = 4$)

Parameter	Lagerungs- dauer Stunden	Verdünnung des Spermas mit Zentrifugation	ohne Zentrifugation
Motilität (%)	0	65 ± 6	65 ± 6
	6	$55^a \pm 6$	$38^b \pm 5$
	24	$43^a \pm 5$	$13^b \pm 5$
lebende Spermien (%)	0	76 ± 5	77 ± 6
	6	75 ± 5	75 ± 6
	24	69 ± 7	66 ± 7
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	$410 \pm 39,8$	$381 \pm 43,6$
	6	$439 \pm 43,3$	$407 \pm 35,0$
	24	$528^a \pm 40,4$	$455^b \pm 34,8$

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

Die extrazelluläre GOT-Aktivität wies bis zu 6 Stunden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Aufbereitungsverfahren auf. Nach 24 Stunden hingegen wurden im zentrifugierten

Sperma (Originalmethode) höhere extrazelluläre GOT-Werte als in nicht zentrifugierten Vergleichsproben gemessen ($p \leq 0,05$; U-Test).

3.2.3. Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma

3.2.3.1. Untersuchungen mit den Originalrezepturen des Laktose-Eidotter-Verdünners nach MERKT und KRAUSE (1966), des Zweiphasenverdünners nach MARTIN, KLUG und GONZEL (1979) sowie des Laktose-ADTA-Verdünners nach NAUMENKOV und ROMANKOVA (1981)

Nach dem Verdünnen (1 Teil Sperma und 2 Teile Verdünner), das beim Zweiphasenverdünner auch eine Zentrifugation und Re-suspension einschloß, waren Motilität und Prozentsatz lebender Spermien in den drei untersuchten Verdünnern nicht verschieden (Tab. 14 und 15).

Tab. 14: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien der verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung bzw. Zentrifugation sowie nach dem Auftauen ($\bar{x} \pm s$; $n = 12$)

	Laktose- Eidotter- Verdüner	Zweiphasen- Verdüner ⁺	Laktose- ADTA- Verdüner
nach der Verdünnung	58 ± 10	62 ± 10	60 ± 10
nach dem Auftauen	$34^a \pm 9$	$47^b \pm 8$	$25^c \pm 5$

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b, c) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

⁺Werte nach Zentrifugation

Tab. 15: Prozentsatz lebender Spermien der verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung bzw. Zentrifugation sowie nach dem Auftauen ($\bar{x} \pm s$; n = 12)

	Laktose- Eidotter- Verdüner	Zweiphasen- Verdüner +	Laktose- ADTA- Verdüner
nach der Verdünnung	72 $\pm$ 12	72 $\pm$ 12	72 $\pm$ 12
nach dem Auftauen	51 ^a $\pm$ 6	53 ^a $\pm$ 5	43 ^b $\pm$ 4

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

+Werte nach Zentrifugation

Die extrazelluläre GOT-Aktivität (Tab. 16) war dagegen im Zweiphasenverdünner nach der Zentrifugation signifikant höher als im Laktose-Eidotter- bzw. Laktose-ADTA-Verdüner ($434 \text{ mU}/10^9$ Spermien gegenüber 293 bzw. $346 \text{ mU}/10^9$ Spermien; Differenz jeweils $p \leq 0,01$; U-Test).

Tab. 16: Extrazelluläre GOT-Aktivität ($\text{mU}/10^9$ Spermien) der verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung bzw. Zentrifugation sowie nach dem Auftauen ($\bar{x} \pm s$; n = 12)

	Laktose- Eidotter- Verdüner	Zweiphasen- Verdüner +	Laktose- ADTA- Verdüner
nach der Verdünnung	293 ^a $\pm$ 104,4	434 ^b $\pm$ 125,7	346 ^a $\pm$ 98,8
nach dem Auftauen	473 $\pm$ 119,1	581 $\pm$ 89,6	509 $\pm$ 115,8

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

+Werte nach Zentrifugation

Nach dem Tiefgefrier- und Auftauvorgang waren keine Unter-

schiede bezüglich des GOT-Wertes mehr gegeben. Es traten jedoch signifikante Unterschiede des Prozentsatzes vorwärtsbeweglicher Spermien auf. Die Motilität war am besten erhalten in Proben mit dem Zweiphasenverdünner (47%), gefolgt vom Laktose-Eidotter-Verdünner (34%) sowie dem Laktose-ADTA-Verdünner (25%; Differenzen jeweils $p \leq 0,01$; U-Test; Tab. 14). Diese Unterschiede wurden zum Teil auch im Prozentsatz lebender Spermien deutlich (Tab. 15).

3.2.3.2. Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen

3.2.3.2.1. Modifizierung des pH

Der pH des Laktose-Eidotter-Verdünners wurde in dieser Versuchsreihe von 5,8 auf den Wert des Verdünners II des Zweiphasenverdünners (pH 6,4) erhöht. Umgekehrt wurde der pH des Verdünners II des Zweiphasenverdünners von 6,4 auf 5,8 erniedrigt und beide modifizierten Verdünnern im split-sample-Verfahren vergleichend untersucht.

Unmittelbar nach der Verdünnung bzw. Zentrifugation waren sowohl der Anteil vorwärtsbeweglicher Spermien als auch der Prozentsatz lebender Spermien in beiden Verdünnern gleich (jeweils 60% vorwärtsbewegliche Spermien bzw. 78% lebende Spermien; Mittelwerte aus je 4 Ejakulaten; Tab. 17).

Die extrazelluläre GOT-Aktivität hingegen war im modifizierten Verdünner II des Zweiphasenverdünners signifikant höher als im Laktose-Eidotter-Verdünner (Tab. 17; $p \leq 0,05$; U-Test). Der Prozentsatz lebender Spermien variierte nach dem Auftauen nicht signifikant (58% bzw. 55% lebende Spermien). Die extrazelluläre GOT-Aktivität war im modifizierten Verdünner II des Zweiphasenverdünners signifikant höher als im modifizierten

Laktose-Eidotter-Verdünner ($p \leq 0,05$; U-Test). Im Vergleich zu den Auftauergebnissen, die mit den Originalverdünnern erzielt worden waren (Tab. 14), war im modifizierten Laktose-Eidotter-Verdünner die Motilität praktisch unverändert (vorher 34%, jetzt 35%). Dagegen bewirkte die Senkung des pH-Wertes der zweiten Komponente des Zweiphasenverdünners von 6,4 auf 5,8 eine deutliche Reduzierung der Auftaurate (Original 47%, modifizierter pH 18%).

Tab. 17: Auswirkungen einer Veränderung des pH des Laktose-Eidotter-Verdünners sowie des Verdünners II des Zweiphasenverdünners auf Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; $n = 4$)

Parameter	nach der Verdünnung		nach dem Auftauen	
	Laktose-Eidotter- Verdünner	Verdünner II	Laktose-Eidotter- Verdünner	Verdünner II
Motilität (%)	60 ± 0	60 ± 0	$35^a \pm 6$	$18^b \pm 5$
lebende Spermien (%)	78 ± 3	78 ± 3	58 ± 3	55 ± 6
GOT ($\text{mU}/10^9$ Spermien)	$434^a \pm 37,4$	$518^b \pm 67,3$	$545^a \pm 19,5$	$635^b \pm 10,6$

Durchschnittswerte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b) innerhalb eines Verarbeitungsschrittes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

3.2.3.2.2. Modifizierung der Osmolalität

Um den Einfluß des osmotischen Druckes zu untersuchen, wurde in dieser Versuchsreihe der osmotische Druck des Laktose-Eidotter-Verdünners von 364 mOsm/kg auf den Wert des Laktose- α DTA-Verdünners (406 mOsm/kg) erhöht. Gleichzeitig wurde der osmotische Druck des Laktose- α DTA-Verdünners von 406 mOsm/kg auf

364 mOsm/kg gesenkt und beide modifizierten Verdüner miteinander verglichen. Der pH des modifizierten Laktose-Eidotter-Verdüners lag wie beim Originalverdünner bei 5,8, der pH des modifizierten Laktose-ADTA-Verdüners betrug 6,0 (Originalverdünner 6,1).

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien war nach der Verdünnung in beiden modifizierten Verdünnern gleich (68%; Tab. 18) und lag etwas über den Werten der Versuche unter Verwendung der Originalverdünner (58 bzw. 60%; Tab. 14). Diese Situation wurde auch durch den gleichzeitig ermittelten jeweiligen Prozentsatz lebender Spermien bestätigt.

Tab. 18: Auswirkungen einer Veränderung der Osmolalität des Laktose-Eidotter-Verdüners bzw. des Laktose-ADTA-Verdüners auf Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; n = 4)

Parameter	nach der Verdünnung		nach dem Auftauen	
	Laktose-Eidotter-Verdüner	Laktose-ADTA-Verdüner	Laktose-Eidotter-Verdüner	Laktose-ADTA-Verdüner
Motilität (%)	68 $\pm$ 10	68 $\pm$ 10	35 $\pm$ 6	23 $\pm$ 10
lebende Spermien (%)	77 $\pm$ 10	77 $\pm$ 6	57 $\pm$ 6	58 $\pm$ 2
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	340 $\pm$ 45,3	307 $\pm$ 51,3	600 $\pm$ 60,3	541 $\pm$ 24,0

Nach dem Auftauen wurden Motilitätsraten von 35% (modifizierter Laktose-Eidotter-Verdüner) bzw. 23% (modifizierter Laktose-ADTA-Verdüner) festgestellt. Damit wurden fast die gleichen Ergebnisse wie bei Verwendung der Originalverdünner (siehe Tab. 14 und 18) erzielt. Im übrigen konnten sowohl beim Prozentsatz lebender Spermien als auch mit dem Parameter extra-

zelluläre GOT-Aktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen den modifizierten Verdünnern ermittelt werden.

3.2.3.2.3. Variation des Glycerinanteils

Der Laktose-Eidotter-Verdüner nach MERKT und KRAUSE (1966) mit einer Glycerinkonzentration von 5% (Originalverdünner) wurde mit einem modifizierten Laktose-Eidotter-Verdüner verglichen, der eine Glycerinkonzentration von 3,5% aufwies.

Der pH des Originalverdünners mit 5% Glycerin sowie des modifizierten Verdünners mit 3,5% Glycerin lag nach der Herstellung bei 5,8.

Bezüglich der Parameter Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität bestanden bei den Glycerinkonzentrationen von 3,5 und 5% im Laktose-Eidotter-Verdüner keine signifikanten Unterschiede (Tab. 19).

Tab. 19: Einfluß unterschiedlicher Glycerinkonzentrationen des Laktose-Eidotter-Verdünners auf Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und GOT-Aktivität nach der Verdünnung sowie nach dem Auftauen ($\bar{x} \pm s$; n = 4)

	Glycerin (%)	Motilität (%)	lebende Spermien(%)	GOT-Aktivität (mU/10 ⁶ Spermien)
nach der Verdünnung	3,5	60 $\pm$ 0	78 $\pm$ 3	429 $\pm$ 49,4
	5,0	60 $\pm$ 0	78 $\pm$ 2	443 $\pm$ 47,7
nach dem Auftauen	3,5	31 $\pm$ 6	59 $\pm$ 3	535 $\pm$ 45,9
	5,0	33 $\pm$ 5	57 $\pm$ 3	549 $\pm$ 45,6

3.2.4. Flüssigkonservierung von Rüdensperma

3.2.4.1. Untersuchungen mit den Originalrezepturen des Natriumzitrat-Verdünners nach FOOTE und LEONHARD (1964) sowie des TRIS-Verdünners nach GILL et al. (1970)

Die für die Untersuchungen zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierung verwendeten Rüdenejakulate wiesen alle ein physiologisches Spermaabild auf. Die Werte der für die weiteren Untersuchungen ausgewählten Parameter sind in Tab. 20 zusammengefaßt.

Tab. 20: Ausgewählte Parameter im unverdünnten Rüdensperma zur Beurteilung für die Untersuchungen zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierung (3 Rüden, je 4 Ejakulate; $\bar{x} \pm s$)

Rüde	pH	Osmolalität (mOsm/kg)	vorwärtsbewegliche Spermien(%)	Prozent lebende Spermien	GOT-Aktivität (mU/10 ⁶ Spermien)
A	6,0 $\pm 0,6$	305 $\pm 6,6$	81 $\pm 6,4$	91 $\pm 4,5$	103 $\pm 22,6$
B	5,8 $\pm 0,1$	309 $\pm 2,3$	78 $\pm 7,1$	91 $\pm 3,2$	125 $\pm 11,4$
C	5,9 $\pm 0,1$	304 $\pm 3,3$	78 $\pm 7,1$	91 $\pm 2,4$	142 $\pm 12,9$

Für die Flüssigkonservierung von Rüdensperma wurden der Natriumzitrat-Verdünnern nach FOOTE und LEONHARD (1964) sowie der TRIS-Verdünnern nach GILL et al. (1970) verwendet. Als 3. Verdünnern wurde ein modifizierter TRIS-Verdünnern nach GILL et al. (1970), der kein Glycerin enthielt, in die Untersuchungen einbezogen.

Der pH aller drei verwendeten Verdünnern lag bei 7,0. Dieser Wert blieb auch während einer 24-stündigen Lagerung bei +5°C

nahezu konstant. Nach der Verdünnung (1 Teil Sperma und 3 Teile Verdünner) wurden pH-Werte von 6,7 (Natriumzitratverdünner) sowie 6,9 (originaler und modifizierter TRIS-Verdünner) in den verdünnten Samenproben gemessen. Im Natriumzitrat-verdünnten Sperma stieg der pH nach 24 Stunden Lagerung bei + 5° C auf 6,8, im TRIS-verdünnten Sperma blieb der pH konstant bei 6,9.

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien zeigte nach der Verdünnung und bis zu 6 Stunden Lagerung bei + 5° C keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verdünnern (Tab. 21). Nach 24 Stunden Lagerung waren im modifizierten TRIS-Verdünner ohne Glyzerin signifikant mehr vorwärtsbewegliche Spermien (67%) vorhanden, als im originalen TRIS-Verdünner sowie im Natriumzitratverdünner (48 bzw. 54%; Differenz zum modifizierten TRIS-Verdünner jeweils $p \leq 0,01$; U-Test).

Tab. 21: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, Prozentsatz lebender Spermien sowie extrazelluläre GOT-Aktivität in verdünnten Spermaproben ($\bar{x} \pm s$; 3 Rüden, je 4 Ejakulate)

Parameter	Lagerungszeit Stunden	Natrium- zitrat	Verdünner	
			TRIS- Original	TRIS ohne Glyzerin
Motilität (%)	0	81 $\pm$ 5	81 $\pm$ 5	82 $\pm$ 5
	6	73 $\pm$ 7	70 $\pm$ 7	75 $\pm$ 7
	24	54 ^a $\pm$ 9	48 ^a $\pm$ 10	67 ^b $\pm$ 7
lebende Spermien (%)	0	91 $\pm$ 3	90 $\pm$ 3	92 $\pm$ 3
	6	89 $\pm$ 3	87 $\pm$ 2	87 $\pm$ 3
	24	84 $\pm$ 3	83 $\pm$ 3	85 $\pm$ 3
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	172 $\pm$ 47,2	231 $\pm$ 65,1	178 $\pm$ 42,5
	6	229 ^a $\pm$ 42,4	309 ^b $\pm$ 68,9	251 ^b $\pm$ 44,9
	24	322 $\pm$ 67,0	397 $\pm$ 60,9	346 $\pm$ 68,4

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

Der Prozentsatz lebender Spermien nahm während der 24 Stunden Lagerung bei + 5° C leicht ab, zwischen den untersuchten Verdünnern waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Tab. 21).

Der extrazelluläre GOT-Gehalt der verdünnten Spermaproben variierte in Abhängigkeit vom Untersuchungszeitpunkt (Tab. 21). Unmittelbar nach der Verdünnung sowie nach 24 Stunden Aufbewahrung bei + 5° C waren keine Unterschiede zwischen den Verdünnern festzustellen. Nach 6 Stunden hingegen wurden im Natriumzitat-Verdünner niedrigere Werte als in den beiden TRIS-Verdünnern gemessen ($p \leq 0,01$; U-Test).

3.2.4.2. Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen

3.2.4.2.1. Tri-Natriumzitat-2-Hydrat

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluß der Puffersubstanz Tri-Natriumzitat-2-Hydrat untersucht. Hierzu wurden unterschiedliche Tri-Natriumzitat-2-Hydrat Gehalte (0,58 g, 1,16 g, 2,32 g) des Natriumzitat-Verdünners nach FOOTE und LEONHARD (1964) verglichen. Im originalen Natriumzitat-Verdünner sind 1,16 g Tri-Natriumzitat-2-Hydrat enthalten.

Der pH der Verdünner betrug 6,7 (0,58 g Natriumzitat), 6,9 (1,16 g Natriumzitat) bzw. 7,1 (2,32 g Natriumzitat; Mittelwerte aus je 4 Verdünnerproben). In den verdünnten Spermaproben (1 Teil Sperma und 3 Teile Verdünner) wurden pH-Werte von 6,7, 6,9 bzw. 7,1 gemessen. Der pH des verdünnten Samens entsprach somit dem der Verdünner. Die pH-Werte änderten sich während der 24 Stunden Aufbewahrung bei + 5° C nicht.

Der osmotische Druck der Verdünner reichte von 280 mOsm/kg (0,58 g Natriumzitat), über 329 mOsm/kg (1,16 g Natriumzitat)

bis zu 470 mOsm/kg (2,32 g Natriumzitrat). Bei der Messung der Osmolalität der verdünnten (1+3) Spermaproben wurden entsprechende Werte von 290, 318 bzw. 428 mOsm/kg ermittelt.

In Tab. 22 ist der Einfluß unterschiedlicher Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat Gehalte des Natriumzitrat-Verdünners auf Motilität, Prozentsatz lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität dargestellt.

Unmittelbar nach der Verdünnung war die Motilität unabhängig vom Anteil an Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat sehr gut (75%, 75% bzw. 73%; Tab. 22). Bereits nach 6 Stunden Lagerzeit bei + 5° C waren jedoch in Proben mit dem höchsten Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat Gehalt (2,32 g) die Motilität deutlich schlechter (45% gegenüber jeweils 65%; Differenz jeweils $p \leq 0,05$; U-Test). Diese Tendenz war nach 24 Stunden Konservierung noch ausgeprägter (9% gegenüber 53% bzw. 55%; Differenz jeweils $p \leq 0,05$; U-Test). Diese Unterschiede traten wie schon in vorhergehenden Versuchsreihen im Prozentsatz lebender Spermien nicht in Erscheinung. In den Proben mit dem höchsten Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat Anteil waren sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden Aufbewahrung signifikant höhere GOT- Werte zu beobachten (Differenz jeweils $p \leq 0,05$; U-Test).

Tab. 22: Einfluß unterschiedlicher Tri-Natriumzitat-2-Hydrat Gehalte des Natriumzitat-Verdünners auf Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; n = 4)

Parameter	Lagerungs- zeit Stunden	Tri-Natriumzitat-2-Hydrat Gehalt (g)		
		0,58	1,16	2,32
Motilität (%)	0	75 $\pm$ 6	75 $\pm$ 6	73 $\pm$ 5
	6	65 ^a $\pm$ 6	65 ^a $\pm$ 6	45 ^b $\pm$ 13
	24	53 ^a $\pm$ 5	55 ^a $\pm$ 5	9 ^b $\pm$ 3
lebende Spermien (%)	0	82 $\pm$ 3	83 $\pm$ 2	81 $\pm$ 4
	6	78 $\pm$ 3	80 $\pm$ 3	76 $\pm$ 5
	24	71 $\pm$ 3	70 $\pm$ 4	67 $\pm$ 7
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	153 $\pm$ 25,2	156 $\pm$ 19,5	204 $\pm$ 32,6
	6	205 ^a $\pm$ 20,0	227 ^a $\pm$ 40,6	291 ^b $\pm$ 31,1
	24	297 ^a $\pm$ 39,8	299 ^a $\pm$ 28,1	389 ^b $\pm$ 37,2

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

3.2.4.2.2. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Der Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) auf die Vitalität der Spermien wurde am Beispiel des modifizierten TRIS-Verdünners nach GILL et al. (1970) - ohne Glyzerinanteil - untersucht. Dabei wurden Gehalte von 1,8g, 2,4g und 3,6g TRIS des modifizierten TRIS-Verdünners miteinander verglichen. Der Originalverdünner enthält 2,4g TRIS.

Die pH-Messung der Verdünner ergab Werte von 5,7 (1,8g TRIS), 7,0 (2,4g TRIS) und 8,1 (3,6g TRIS) nach der Herstellung. Wurden die Verdünner 24 Stunden bei + 5°C gelagert, stieg deren pH-Wert entsprechend auf 5,8, 7,2 bzw. 8,3. Nach der Verdünnung (1 Teil Sperma und 3 Teile Verdünner) lag der pH der

verdünnten Spermaproben bei 5,8 (1,8g TRIS), 7,0 (2,4g TRIS) bzw. 8,1 (3,6g TRIS). Der pH des verdünnten Samens blieb während der 24- stündigen Lagerung im TRIS-Verdünner mit 1,8g TRIS konstant bei 5,8, im TRIS-Verdünner mit 2,4g TRIS stieg er auf 7,2 und im TRIS-Verdünner mit 3,6g TRIS auf 8,1.

Der osmotische Druck der Verdünner (Mittelwerte aus je 4 Proben) reichte von 298 mOsm/kg (1,8g TRIS) über 325 mOsm/kg (2,4g TRIS) bis 440 mOsm/kg (3,6g TRIS). Die entsprechenden Werte in den verdünnten Spermaproben lagen bei 302, 321 sowie 415 mOsm/kg.

Unmittelbar nach der Verdünnung waren in allen drei Verdünnern gleich viele vorwärtsbewegliche Spermien vorhanden (73%; Tab. 23). Nach 6 Stunden Lagerung bei + 5° C waren im Verdünner mit 1,8g TRIS signifikant weniger vorwärtsbewegliche Spermien als in den beiden anderen Verdünnern vorhanden (9% gegenüber 68% bzw. 50%; $p \leq 0,05$; U-Test). Nach 24 Stunden Lagerung bei + 5° C wurden im Verdünner mit 1,8g TRIS keine vorwärtsbeweglichen Spermien mehr beobachtet, im Verdünner mit 2,4g TRIS waren 55% und im Verdünner mit 3,6g TRIS 35% vorwärtsbewegliche Spermien vorhanden (Differenz jeweils $p \leq 0,05$; U-Test). Der Prozentsatz lebender Spermien nahm während der 24-stündigen Aufbewahrung bei + 5° C in allen 3 Verdünnern gleichmäßig ab, signifikante Unterschiede zwischen den Verdünnern wurden nicht ermittelt.

Nach der Verdünnung wurden signifikant höhere extrazelluläre GOT-Werte im Verdünner mit 3,6g TRIS als im Verdünner mit 2,4g TRIS (Originalverdünner) gemessen (Differenz $p \leq 0,05$; U-Test). Die signifikanten Differenzen zwischen diesen beiden Verdünnern bestanden auch nach 6 und 24 Stunden Lagerung bei + 5° C (Tab. 23).

Tab. 23: Einfluß unterschiedlicher Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Gehalte des modifizierten TRIS-Verdünnern auf Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; n = 4)

Parameter	Lagerungs- zeit Stunden	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Gehalt(g)		
		1,8	2,4	3,6
Motilität (%)	0	73 $\pm$ 5	73 $\pm$ 5	73 $\pm$ 5
	6	9 ^a $\pm$ 3	68 ^b $\pm$ 5	50 ^b $\pm$ 14
	24	0 ^a	55 ^b $\pm$ 6	35 ^c $\pm$ 6
lebende	0	86 $\pm$ 4	85 $\pm$ 6	85 $\pm$ 8
Spermien (%)	6	82 $\pm$ 4	83 $\pm$ 6	81 $\pm$ 8
	24	74 $\pm$ 6	76 $\pm$ 5	76 $\pm$ 8
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	0	163 $\pm$ 27,2	136 ^a $\pm$ 14,2	191 ^b $\pm$ 32,4
	6	205 $\pm$ 22,2	175 ^a $\pm$ 19,3	252 ^b $\pm$ 37,6
	24	263 $\pm$ 42,2	13 ^a $\pm$ 26,7	213 ^b $\pm$ 47,7

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b, c) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

3.2.5. Tiefgefrierkonservierung von Rüdensperma

3.2.5.1. Untersuchungen mit den Originalrezepturen des TRIS-Verdünnern nach GILL et al. (1970) sowie des Laktose-Eidotter-Verdünnern nach SEAGER (1969)

Für die Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Rüdensperma wurden der bereits zur Flüssigkonservierung verwendete TRIS-Verdünnern nach GILL et al. sowie der Laktose-Eidotter-Verdünnern nach SEAGER (1969) verwendet. Außerdem wurde ein modifizierter Laktose-Eidotter-Verdünnern nach SEAGER (1969) untersucht, der 8% Glyzerin statt 4% Glyzerin (Originalverdünner) enthielt. Bei der Messung des pH der Verdünner wurden folgende Werte ermittelt: TRIS-Verdünnern pH 7,0; Laktose-Eidotter-Verdünnern

ner mit 4% Glyzerin (Originalverdünner) pH 5,9; modifizierter Laktose-Eidotter-Verdünner mit 8% Glyzerin pH 5,8 (Mittelwerte aus 4 Verdünnerproben). Die Osmolalität der Verdünner betrug 333 mOsm/kg (TRIS-Verdünner) sowie 405 mOsm/kg (Laktose-Eidotter-Verdünner; Mittelwerte aus 4 Verdünnerproben). Diese Werte des osmotischen Druckes beziehen sich jeweils auf die Verdünnung ohne Glyzerin.

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien zeigte nach der Verdünnung keine Unterschiede zwischen den drei Verdünnern (Tab. 24). Nach dem Auftauen wurden im TRIS-Verdünner signifikant mehr vorwärtsbewegliche Spermien als in den Laktose-Eidotter-Verdünnern beobachtet ($p \leq 0,01$; U-Test).

Tab. 24: Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien der verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung sowie nach dem Auftauen ($\bar{x} \pm n$; $n = 12$)

	TRIS- Verdünner	Laktose-Eidotter- Verdünner mit 4% Glyzerin	Laktose-Eidotter- Verdünner mit 8% Glyzerin
nach der Verdünnung	73 ± 5	73 ± 6	72 ± 7
nach dem Auftauen	$47^a \pm 8$	$14^b \pm 8$	$12^b \pm 7$

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

Der Prozentsatz lebender Spermien nahm nach dem Auftauen leicht ab, es konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verdünnern ermittelt werden (Tab. 25).

Tab. 25: Prozentsatz lebender Spermien der verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung sowie nach dem Auftauen ($\bar{x} \pm s$; $n = 12$)

	TRIS- Verdüner	Laktose-Eidotter- Verdüner mit 4% Glyzerin	Laktose-Eidotter- Verdüner mit 8% Glyzerin
nach der Verdünnung	86 $\pm$ 4	84 $\pm$ 4	84 $\pm$ 4
nach dem Auftauen	70 $\pm$ 7	67 $\pm$ 9	69 $\pm$ 10

Auch bei der extrazellulären GOT-Aktivität ließen sich nach der Verdünnung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verdünnern feststellen (Tab. 26). Nach dem Auftauen jedoch wurden im TRIS-verdünnten Sperma höhere GOT-Werte als in den Laktose-Eidotter-Verdünnern gemessen (347 mU/10⁹ Spermien gegenüber 257 bzw. 293 mU/10⁹ Spermien; Differenz jeweils $p \leq 0,01$; U-Test).

Tab. 26: Extrazelluläre GOT-Aktivität (mU/10⁹ Spermien) der verdünnten Spermaproben nach der Verdünnung sowie nach dem Auftauen ($\bar{x} \pm s$; $n = 12$)

	TRIS- Verdüner	Laktose-Eidotter- Verdüner mit 4% Glyzerin	Laktose-Eidotter- Verdüner mit 8% Glyzerin
nach der Verdünnung	193 $\pm$ 50,0	144 $\pm$ 47,2	178 $\pm$ 45,6
nach dem Auftauen	347 ^a $\pm$ 71,3	257 ^b $\pm$ 53,4	293 ^b $\pm$ 49,8

Durchschnittswerte mit verschiedenem Suffix in einer Zeile (a, b) unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,01$; U-Test)

3.2.5.2. Untersuchungen mit den modifizierten Rezepturen

3.2.5.2.1. Modifizierung des pH

Der pH des TRIS-Verdünners wurde auf den Wert des Laktose-Eidotter-Verdünners (pH 5,9) gesenkt. Gleichzeitig wurde der pH des Laktose-Eidotter-Verdünners auf 7,0 - den Wert des TRIS-Verdünners - erhöht. Diese modifizierten Verdünner wurden im split-sample-Verfahren untersucht (4 Ejakulate eines Rüden).

Nach der Verdünnung des Spermas (1 Teil Sperma + 3 Teile Verdünner) wurden in den verdünnten Samenproben pH-Werte von 5,9 (modifizierter TRIS-Verdünner) bzw. 6,7 (modifizierter Laktose-Eidotter-Verdünner) gemessen. Der pH der verdünnten Ejakulate änderte sich nach dem Auftauen nicht. Im Vergleich zu den Versuchen unter Verwendung der Originalverdünner (siehe 3.2.5.1.) wurden damit beim modifizierten TRIS-Verdünner niedrigere pH-Werte der verdünnten Spermaproben (pH 6,9 beim Originalverdünner, pH 5,9 beim modifizierten TRIS-Verdünner) und beim modifizierten Laktose-Eidotter-Verdünner höhere pH-Werte erreicht (pH 6,0 beim Originalverdünner; pH 6,7 beim modifizierten Laktose-Eidotter-Verdünner).

Der osmotische Druck der Verdünner lag bei 325 mOsm/kg (modifizierter TRIS-Verdünner) bzw. 400 mOsm/kg (modifizierter Laktose-Eidotter-Verdünner) und war damit gegenüber den Originalverdünnern (siehe 3.2.5.1.) nur geringfügig verändert.

Der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien war in beiden Verdünnern unmittelbar nach der Verdünnung gleich (75%; Tab. 27). Nach dem Auftauen waren im modifizierten Laktose-Eidotter-Verdünner signifikant mehr vorwärtsbewegliche Spermien vorhanden, als im modifizierten TRIS-Verdünner (45% bzw. 6% vorwärtsbewegliche Spermien; $p \leq 0,05$; U-Test). Bei den Original-

nalverdünnern dagegen war der TRIS-Verdüner dem Laktose-Eidotter-Verdüner bezüglich der Motilität nach dem Auftauen überlegen (47% bzw. 12% vorwärtsbewegliche Spermien; siehe Tab. 24). Der Prozentsatz lebender Spermien nahm bei beiden Verdünnern nach dem Auftauen ab, signifikante Unterschiede zwischen den Verdünnern ließen sich nicht ermitteln (siehe Tab. 27). Im Vergleich zu den Versuchen mit den Originalverdünnern (Tab. 25) wurden ähnliche Werte beobachtet.

Die extrazelluläre GOT-Aktivität war im modifizierten TRIS-Verdüner unmittelbar nach der Verdünnung höher als im modifizierten Laktose-Eidotter-Verdüner (siehe Tab. 27; $p \leq 0,05$; U-Test). Diese Tendenz war auch nach dem Auftauen zu beobachten.

Tab. 27: Auswirkungen einer Veränderung des pH des TRIS-Verdüners sowie des Laktose-Eidotter-Verdüners auf die Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; $n = 4$)

Parameter	nach der Verdünnung		nach dem Auftauen	
	Laktose-Eidotter-Verdüner	TRIS-Verdüner	Laktose-Eidotter-Verdüner	TRIS-Verdüner
Motilität (%)	75 ± 6	75 ± 6	$45^a \pm 6$	$6^b \pm 3$
lebende Spermien (%)	87 ± 4	88 ± 3	71 ± 4	65 ± 5
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	$150^a \pm 29,0$	$260^b \pm 20,8$	$412^a \pm 43,0$	$491^b \pm 23,3$

Durchschnittswerte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b) innerhalb eines Verarbeitungsschrittes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

3.2.5.2.2. Modifizierung der Osmolalität

Der osmotische Druck des TRIS-Verdünners wurde in dieser Versuchsreihe auf 405 mOsm/kg - den Wert des Laktose-Eidotter-Verdünners - erhöht. Der Laktose-Eidotter-Verdünnern wurde auf 333 mOsm/kg erniedrigt. Beide modifizierten Verdünnern wurden im split-sample-Verfahren an 4 Ejakulaten eines Rüden verglichen.

Der osmotische Druck der verdünnten Spermaproben (1 Teil Sperma und 3 Teile Verdünnern) lag bei 378 mOsm/kg (modifizierter TRIS-Verdünnern) bzw. 320 mOsm/kg (modifizierter Laktose-Eidotter-Verdünnern; Mittelwerte aus je 4 Verdünnernproben).

Die Untersuchungen der Parameter Motilität, Prozentsatz lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität (Tab. 28) ergaben ähnliche Werte wie bei den Untersuchungen der Original-Verdünnern (Tab. 24, 25 und 26).

Tab. 28: Auswirkungen einer Veränderung der Osmolalität des TRIS-Verdünners sowie des Laktose-Eidotter-Verdünners auf Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und GOT-Aktivität ($\bar{x} \pm s$; n=4)

Parameter	nach der Verdünnung		nach dem Auftauen	
	Laktose-Eidotter-Verdünnern	TRIS-Verdünnern	Laktose-Eidotter-Verdünnern	TRIS-Verdünnern
Motilität (%)	75 $\pm$ 6	75 $\pm$ 6	8 ^a $\pm$ 3	35 ^b $\pm$ 6
lebende Spermien (%)	89 $\pm$ 3	91 $\pm$ 1	63 $\pm$ 4	64 $\pm$ 9
GOT (mU/10 ⁹ Spermien)	133 ^a $\pm$ 69,4	197 ^b $\pm$ 67,5	265 ^a $\pm$ 108,9	363 ^b $\pm$ 121,4

Durchschnittswerte in einer Zeile mit verschiedenem Suffix (a, b) innerhalb eines Verarbeitungsschrittes unterscheiden sich signifikant ($p \leq 0,05$; U-Test)

Auch nach Veränderung der Osmolalität waren die Auftausergebnisse (% vorwärtsbewegliche Spermien) im TRIS-Verdünner signifikant besser als im modifizierten Laktose-Eidotter-Verdünner (35% bzw. 8%; Differenz $p \leq 0,05$; U-Test). Mit Hilfe der Parameter Prozentsatz lebender Spermien sowie extrazelluläre GOT-Aktivität konnten dagegen die unterschiedlichen Konservierungseigenschaften der modifizierten Verdünner nicht deutlich gemacht werden.

4. DISKUSSION

Die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Verdünner beeinflussen Vitalität und Befruchtungsvermögen der Spermien. Bei den physikalischen Eigenschaften spielen pH (EMMENS, 1947; CHANG und THORSTEINSSON, 1958; VAN DUIJN und RIKMENSCOEL, 1960; STEINBACH und FOOTE, 1967; QUINN und WHITE, 1968; FOOTE, 1970; BARTOOV und MAYEVSKY, 1980; MAKLER et al., 1981) und osmotischer Druck (DREVIUS und ERIKSSON, 1966; DREVIUS, 1972; SMIRNOV und YEMETZ, 1972; MOLLER et al., 1977; FAZANO et al., 1982; FISER und LANGFORD, 1981; TISCHNER, et al. 1980; MAKLER et al., 1981; SCHILLING et al., 1984) eine bedeutende Rolle. Die chemischen Eigenschaften der Verdünner hängen von der Art der verwendeten Puffersubstanzen, Elektrolyte, Nicht-elektrolyte sowie Makromoleküle ab.

Will man die Auswirkungen von Verdünnern bzw. deren Modifizierungen auf die Vitalität der damit verdünnten Spermaproben überprüfen, ermöglicht der Einsatz dieser Spermaproben in der künstlichen Besamung und das damit erzielte Befruchtungsergebnis direkt eine Aussage. Aus versuchstechnischen, organisatorischen und wirtschaftlichen Gründen ist dies aber nur selten möglich, so daß in vielen Fällen auf in-vitro Untersuchungen zurückgegriffen werden muß. Dabei ist der Wahl geeigneter Parameter, die zudem von Spezies zu Spezies verschieden sein können, besondere Aufmerksamkeit zu widmen. Die alleinige Schätzung der Bewegungsaktivität der Spermien zur Beurteilung des Befruchtungsvermögens hat sich als nicht ausreichend erwiesen (LEIDL, 1968; WILMUT und POLGE, 1971 und 1972; GILL et al., 1970; ANDERSEN, 1972; ANDERSON et al., 1980). Man ging daher dazu über, andere Beurteilungskriterien wie die Bestimmung der extrazellulären GOT-Aktivität (GRAHAM et al., 1971; RXTZ und MATTHEUS, 1972; HILLMANN und TREU, 1973 und 1974; KLENNER, 1975; STREZEZEK und SLAWETA, 1984) oder die Beurteilung der

Akrosommorphologie (HEALEY, 1969; QUINN, WHITE und CLEVELAND, 1969; WARNAWSKI, 1971; SAACKE und WHITE, 1972; WATSON und MARTIN, 1972; KLENNER, 1975; HELLEMANN, 1976; MÖLLER et al., 1977; WEITZE, 1977; BAUMGARTL, 1980; FAZANO et al., 1982; PAPA et al., 1982) in die Untersuchungen des verdünnten Spermas mit einzubeziehen. In den eigenen Untersuchungen an den Spezies Schwein, Pferd und Hund wurde als wichtigster Parameter der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, ermittelt durch Schätzung im mikroskopischen Bild, verwendet. Entsprechend den Erfahrungen aus der Literatur wurde beim Schwein zusätzlich die extrazelluläre GOT-Aktivität sowie die morphologische Beurteilung der Akrosomintegrität herangezogen. Bei Pferd und Hund, wo eine Akrosombeurteilung mit lichtmikroskopischen Verfahren nicht möglich ist, wurde zusätzlich zur Motilität der Prozentsatz ungefärbter lebender Spermien (Bromphenolblau-Nigrosin-Färbung) und die extrazelluläre GOT-Aktivität bestimmt.

Für die Untersuchungen zur Flüssigkonservierung von Ebersperma wurden die 3 in der Schweinebesamung routinemäßig verwendeten Verdüner Beltsville, Kiew und Zorlesco miteinander verglichen. Als Grundsubstanzen enthalten diese Verdüner Glukose, Natriumzitrat und Natriumbikarbonat in unterschiedlichen Konzentrationen. Der Beltsville-Verdüner enthält zusätzlich Kaliumchlorid, der Kiew-Verdüner ADTA zur Stoffwechselhemmung. Auch beim Zorlesco-Verdüner handelt es sich um einen Glukose-ADTA-Verdüner, der im Gegensatz zum Beltsville- und Kiew-Verdüner BSA enthält. BSA besitzt nach Untersuchungen von HARRISON, DOTT und FORSTER (1978) sowie von PAQUIGNON et al. (1980 b) eine positive Wirkung auf die Spermienmotilität. Die zur Flüssigkonservierung von Schweinesperma verwendeten Verdüner unterscheiden sich neben ihrer Zusammensetzung auch durch ihre physikalischen Eigenschaften, d.h. pH und osmotischen Druck: Beltsville-Verdüner pH 8,1 und 309 mOsm/kg; Kiew-Verdüner pH 6,8 und 395 mOsm/kg; Zorlesco-Verdüner pH 6,7 und 271 mOsm/kg. Diese unterschiedlichen Eigenschaften resultieren aus der vari-

ierenden Zusammensetzung der Verdünner. Die Unterschiede im pH-Wert dürften vorwiegend durch die verschiedenen hohen Anteile der Puffersubstanzen Natriumbikarbonat sowie Tri-Natriumzitat-2-Hydrat (Seite 33) zustandekommen, während der osmotische Druck der Verdünner in erster Linie durch den Gehalt an Glukose bestimmt wird.

Als geeignetster Parameter für die unterschiedlichen Konservierungseigenschaften der Originalverdünner erwies sich der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien. War am Tage der Spermagewinnung und Verdünnung die Motilität in allen Verdünnern gleich, so ergaben sich nach 48 und 96 Stunden Lagerungsdauer bei + 15° C jeweils deutliche Unterschiede. Die besten Motilitätsraten traten dabei in Spermaproben auf, die mit Zorlesco-Verdünner, gefolgt von Kiew- und Beltsville-Verdünner, konserviert worden waren. Dies stimmt mit den Untersuchungen von AMLID et al. (1984), AALBERS et al. (1983) und PURSEL (1983) überein. Die jeweils parallel bestimmten Parameter GOT und Akrosomintegrität als Maßstab für die Membranschädigung der Spermienzelle wiesen eine tendenzielle Übereinstimmung auf. Die gleichlaufenden Veränderungen können als Hinweis angesehen werden, daß morphologisch nachweisbare Schäden am Akrosom auch mit einem Austritt von GOT in das extrazelluläre Medium verbunden sind. Dies muß aber, wie das Beispiel des Zorlesco-Verdünners zeigt, nicht unmittelbar auch zu einer Beeinträchtigung der Motilität führen. Auch HILLMANN und TREU (1973) stellten bei aufgetauten Eberspermien Beziehungen zwischen weitgehend zerstörten Spermien und der extrazellulären GOT fest, während zwischen dem Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien und morphologisch normalen Spermien kein Zusammenhang bestand. Die Autoren verwiesen daher darauf, daß hohe Motilitätsraten keine Gewähr für die Integrität der Samenzellen bieten. Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen, die mit dem Kiew- und Zorlesco-Verdünner erzielt wurden, bestätigen die Untersuchungen von GOTTARDI et al. (1980), die beim Zorlesco-Verdünner ebenfalls höhere GOT-Aktivitäten als

im Kiew-Verdünner ermittelten. Bezüglich der Akrosomintegrität zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie bei den Untersuchungen von FAZANO et al. (1982), die im Kiew-Verdünner eine bessere Erhaltung der Akrosomintegrität der Spermien als im Zorlesco-Verdünner feststellten und dabei auf die Bedeutung des osmotischen Druckes der Verdünner für diesen Parameter hinwiesen. Der Einfluß des osmotischen Druckes des Kiew- und Zorlesco-Verdünners wurde untersucht, indem der hypertone Kiew-Verdünner (395 mOsm/kg) auf den hypotonen Wert des Zorlesco-Verdünners (271 mOsm/kg) gesenkt wurde und gleichzeitig der osmotische Druck des Zorlesco-Verdünners in den hypertonen Bereich (395 mOsm/kg) erhöht wurde. Sowohl die extrazelluläre GOT-Aktivität als auch der Anteil der Spermien mit normalem apikalen Rand waren im modifizierten, jetzt hypotonen Kiew-Verdünner höher als im modifizierten, jetzt hypertonen Zorlesco-Verdünner. Dagegen blieben die Motilitätsraten im Vergleich zu den Originalverdünnern praktisch unverändert, d.h. auch hier war keine direkte Beziehung zwischen Membranschädigung und Motilität zu beobachten. Die Untersuchungen belegen, daß unabhängig von der chemischen Zusammensetzung des Verdünners ein hypotoner osmotischer Druck die Membranintegrität der Spermienzelle negativ beeinflußt. Auch in Arbeiten von DREVIUS und ERIKSSON (1966) sowie DREVIUS (1972) wird auf den negativen Einfluß abnehmender, also hypotoner Osmolalität hingewiesen und Membranveränderungen der Spermienzelle in Form von Anschwellen beschrieben.

Daß auch Verdünnerkomponenten wie BSA, die keinen Einfluß auf pH und Osmolalität ausüben, die Konservierungseigenschaften eines Verdünners beeinflussen können, konnte durch Zusatz von BSA zum Beltsville- bzw. Kiew-Verdünner gezeigt werden. Während diese Verdünner im Originalrezept dem Zorlesco-Verdünner (Originalverdünner mit 0,5% BSA) im Hinblick auf die Erhaltung der Motilität deutlich unterlegen waren, war dieser Unterschied nicht mehr zu beobachten, wenn alle 3 Verdünner 0,5% BSA enthielten. Entsprechende Beobachtungen des motilitätsfördernden Effektes

von BSA werden von BREDDERMANN und FOOTE (1971), HARRISON, DOTT und FOSTER (1978) sowie PAQUIGNON et al. (1980 b) berichtet. Auch in dieser Versuchsreihe wurden Veränderungen der Motilität nicht direkt von den Parametern GOT und NAR reflektiert.

Bei der Flüssigkonservierung von Hengstsperma wurden der Glukose-Eidotter-Verdünner nach GÜTZE, 1949 (pH 5,8; 322 mOsm/kg), der Magermilchverdünner nach COOPER und WERT, 1975 (pH 7,0; 366 mOsm/kg) und das Dimitropoulos Medium nach VAN DER HOLST, 1983 (pH 7,0; 298 mOsm/kg) anhand der Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), des Prozentsatzes lebender Spermien und der extrazellulären GOT-Aktivität verglichen. Der Glukose-Eidotter-Verdünner wurde bereits 1949 von GÜTZE entwickelt, er wird heute noch erfolgreich zur Spermakonservierung (GLATZEL et al., 1981) eingesetzt. Im Gegensatz zum Magermilchverdünner und dem Dimitropoulos Medium, die Natriumbikarbonat bzw. Tri-Natriumzitat-2-Hydrat als Puffersubstanz enthalten, wird dem Glukose-Eidotter-Verdünner keinerlei Puffersubstanz zur Regulierung des pH-Wertes zugesetzt. Trotzdem konnten während einer 24-stündigen Lagerung bei + 5° C keine Veränderungen im pH-Wert der verdünnten Spermaproben beobachtet werden. Signifikante Unterschiede zwischen den Verdünnern nach 24 Stunden Aufbewahrung bei + 5° C, die sich anhand der Motilität ergaben, ließen sich mit Hilfe der Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin und der extrazellulären GOT-Aktivität nicht nachweisen. Dies würde bedeuten, daß durch die Verdünnung und Abkühlung auf + 5° C nur der Stoffwechsel der Spermien und in Folge davon auch die Motilität der Spermien reduziert wird, die Spermienmembran jedoch weitgehend intakt bleibt.

Wurden Spermaproben mit dem Dimitropoulos Medium verdünnt, ohne daß eine Zentrifugation erfolgte, waren die Motilitätsraten nach 24 Stunden Lagerung bei + 5° C signifikant schlechter als in Kontrollproben, die mit dem Dimitropoulos Medium ver-

dünnt und anschließend zentrifugiert worden waren (Originalmethode). Die extrazelluläre GOT-Aktivität hingegen zeigte eine signifikant höhere GOT-Aktivität in zentrifugierten Spermaproben nach 24 Stunden Lagerung bei $+ 5^{\circ} \text{C}$ als in Vergleichsproben, die nicht zentrifugiert worden waren. Offenbar wirkt sich die mit der Zentrifugation beabsichtigte Entfernung des Seminalplasmas positiv auf die Motilität der Spermien aus. Auch RAJAMANNAN et al. (1968), NISHIKAWA (1975) und MARTIN, KLUG und GONZEL (1979) beobachteten einen geringeren Motilitätsabfall des verdünnten Spermas wenn das Sperma zentrifugiert und das Seminalplasma entfernt wurde. Diese Ergebnisse stehen in Gegensatz zu Untersuchungen von MEYER (1951), HESS et al. (1968), die wie BADER (1970) eine Reduzierung der Bewegungsaktivität nach Zentrifugation feststellten. Nach PICKETT et al. (1975b) hängt die Motilität nach Zentrifugation von der verbleibenden Endkonzentration an Seminalplasma, vom Verdünnungsgrad und von der Zentrifugationsstärke ab. Bei der Zentrifugation, Entfernung des Seminalplasmas und Resuspension ändert sich auch die Viskosität und die Nährsubstratkonzentration des Spermienmilieus, was zu einer veränderten Motilität führen kann. Die durch die Zentrifugation verursachte Membranschädigung, die anhand der extrazellulären GOT-Aktivität nachgewiesen wurde, wurde auch in Untersuchungen von BAUMGARTL (1980) festgestellt. Die Autorin zeigte, daß die Zentrifugation von Pferdesperma zu einem Anstieg hochgradiger Veränderungen des Akrosoms führt.

Die Veränderung des pH des Glukose-Eidotter-Verdünnerns in den neutralen Bereich (pH 7,0) und des Dimitropoulos Mediums in den sauren Bereich (pH 5,8) führte im Dimitropoulos Medium zu einem starken Motilitätsabfall. Der negative Einfluß eines sauren pH wurde auch von EMMENS (1947) bei tiefgefrorenen Kaninchenspermien festgestellt: Nach dem Auftauen sind die Spermien unterhalb eines pH von 5,8 unbeweglich und sterben rasch ab.

Die Tiefgefrierkonservierung von Hengstsperma wurde mit dem in der Praxis gebräuchlichen Laktose-Eidotter-Verdüner nach MERKT und KRAUSE, 1966 (pH 5,8; 364 mOsm/kg), dem Zweiphasenverdünner nach MARTIN, KLUG und GÖNZEL, 1979 (Verdüner I pH 6,7; 398 mOsm/kg; Verdüner II pH 6,4; 378 mOsm/kg) und dem Laktose- α -DTA-Verdüner nach NAUMENKOV und ROMANKOVA, 1981 (pH 6,1; 406 mOsm/kg) untersucht. Die Beurteilung der Konservierungseigenschaften erfolgte mit Hilfe der gleichen Parameter wie bei der Flüssigkonservierung von Hengstsperma. Der Laktose-Eidotter-Verdüner enthält keine zusätzlichen puffernden Bestandteile, während im Zweiphasen- und Laktose- α -DTA-Verdüner Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat und Natriumbikarbonat enthalten sind. Zur Stoffwechselhemmung wird den beiden letzten Verdünnern ausserdem α -DTA zugesetzt. Der osmotische Druck hingegen variierte zwischen den Verdünnern nur gering, er lag bei allen drei Verdünnern im hypertonen Bereich.

Die Motilität war nach dem Auftauen im Zweiphasenverdünner am besten erhalten, gefolgt vom Laktose-Eidotter- und Laktose- α -DTA-Verdüner. Beim Zweiphasenverdünner entsprachen die Auftauergebnisse (47% vorwärtsbewegliche Spermien) den Untersuchungen von MARTIN et al., 1979 (42% vorwärtsbewegliche Spermien), während beim Laktose-Eidotter-Verdüner mit pailletiertem Sperma (34% vorwärtsbewegliche Spermien) die Ergebnisse von MERKT und KRAUSE, 1966 mit pelletiertem Sperma (Auftauraten von 50 - 70% vorwärtsbeweglichen Spermien) nicht reproduziert werden konnten.

Die im Zweiphasenverdünner festgestellten erhöhten GOT-Werte des verdünnten Spermas sind als Folge der Zentrifugation des verdünnten Spermas anzusehen, wie bereits bei der Flüssigkonservierung von Hengstsperma diskutiert wurde. Inwieweit sich die Membranschädigungen durch eine Verminderung der Zentrifugationsstärke verringern lassen und gleichzeitig eine ausreichende Konzentration des Spermas erreicht werden kann, bleibt Gegenstand

weiterer Untersuchungen.

Der Einfluß des sauren pH um den Bereich pH 5,8 wurde untersucht, indem der pH des Verdünners II des Zweiphasenverdünners auf den Wert 5,8 eingestellt wurde und der Laktose-Eidotter-Verdünner von 5,8 auf pH 6,4 erhöht wurde. Die Senkung des pH-Wertes der zweiten Komponente des Zweiphasenverdünners führte zu einer deutlichen Reduzierung der Auftauraten. Im sauren Bereich um den pH 5,8 wurde, wie in Untersuchungen von EMMENS (1947), unabhängig von der Art des Verdünners, eine deutlich schlechtere Motilität nach dem Auftauen beobachtet als bei den Kontrollverdünnern mit pH 6,4.

Die Variation des Glyzerinanteils beim Laktose-Eidotter-Verdünner (Originalverdünner 5,0% Glyzerin, Vergleichsverdünner 3,5% Glyzerin) ergab keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Parameter Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität. Entsprechende Ergebnisse erbrachten auch die Untersuchungen von GUAY et al. (1981). Dies steht im Gegensatz zur Situation beim Ebersamen, wo GRAHAM et al. (1971 und 1972), GRAHAM und CRABO (1972) sowie BOWER et al. (1973) berichteten, daß Glyzerin zur Freisetzung von GOT und anderen intrazellulären Enzymen führte.

Zur Flüssigkonservierung von Rüdensperma wurden in der Praxis bewährte Verdünner mit den Puffersubstanzen Tri-Natriumzitat-2-Hydrat (Natriumzitat-Verdünner nach FOOTE und LEONHARD, 1964; pH 7,0 und 325 mOsm/kg) sowie Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS-Verdünner nach GILL et al., 1970; pH 7,0 und 326 mOsm/kg) verglichen. Als dritter Verdünner wurde ein modifizierter TRIS-Verdünner nach GILL et al. (1970) ohne Glyzerinanteil untersucht. Die Beurteilung der Verdünner erfolgte anhand der Motilität (% vorwärtsbewegliche Spermien), des Prozentsatzes lebender Spermien sowie der extrazellulären GOT-Aktivität der ver-

dünnten Spermaproben nach der Verdünnung sowie nach 6 und 24 Stunden Aufbewahrung bei + 5° C. Trotz unterschiedlicher Zusammensetzung der Verdünner zeigten sie praktisch keine Abweichungen hinsichtlich des pH-Wertes und des osmotischen Druckes. Unabhängig davon wurde primär die Motilität in verschieden starkem Maße beeinflusst, während sich diese Unterschiede mit Hilfe des Prozentsatzes lebender Spermien und der extrazellulären GOT-Aktivität nicht belegen ließen. GILL et al. (1970) gaben an, daß nach 24 Stunden Lagerung bei + 5° C noch zwischen 77 und 79% motile Spermien im TRIS-Verdünner vorhanden waren. Diese Motilitätsrate ließ sich in den vorliegenden Untersuchungen (48% vorwärtsbewegliche Spermien nach 24 Stunden Aufbewahrung bei + 5° C) nicht reproduzieren. Im TRIS-Verdünner, der kein Glyzerin enthielt, wurden dagegen bessere Motilitätsraten (67% vorwärtsbewegliche Spermien) als im Originalverdünner mit Glyzerin beobachtet. Auch FOOTE und LEONHARD (1964) berichteten von negativen Auswirkungen des Glyzerins auf die Motilität verdünnten Rüdenspermas. Mit dem Natriumzitrat-Verdünner erhielten FOOTE und LEONHARD (1964) bei + 5° C Aufbewahrungstemperatur nach einem Tag 78% motile Spermien und nach 13 Tagen noch 40% motile Spermien. In der vorliegenden Arbeit lagen die Motilitätsraten (% vorwärtsbewegliche Spermien) nach einem Tag Aufbewahrung bei + 5° C bei 54%.

Der Einfluß der Puffersubstanz Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat auf Motilität (Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien), Prozentsatz lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität von verdünnten Rüdenspermaproben wurde anhand unterschiedlicher Gehalte (0,58g, 1,16g Originalverdünner, 2,32g) des Natriumzitrat-Verdünners nach FOOTE und LEONHARD (1964) untersucht. Die unterschiedlichen Gehalte von Tri-Natriumzitrat-2-Hydrat wirkten sich primär auf Motilität und extrazelluläre GOT-Aktivität aus, wohingegen beim Parameter Prozentsatz lebender Spermien diese Unterschiede nicht in Erscheinung traten. Demnach sind dadurch

in erster Linie die Motilität und die Membranintegrität der Spermien betroffen, der Anteil lebender Spermien hingegen nicht.

Auch der Einfluß unterschiedlicher Gehalte der Puffersubstanz Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (1,8g, 2,4g Originalverdünner, 3,6g TRIS; TRIS-Verdünner nach GILL et al., 1970) reflektierte sich primär in Unterschieden der Motilität und der extrazellulären GOT-Aktivität; der Prozentsatz lebender Spermien hingegen war nicht betroffen. Nach SENEGACNIK (1982) führt TRIS zu einer Verminderung der Fruktolyserate und verbessert somit den Energiehaushalt der Spermienzelle. In den eigenen Untersuchungen bei dem niedrigen TRIS Gehalt von 1,8g kam diese TRIS-Wirkung demnach nicht zur Geltung und führte zu einer verstärkten Reduzierung der Motilität.

Für die Tiefgefrierkonservierung von Rüdensperma wurden der bereits zur Flüssigkonservierung von GILL et al. (1970) verwendete TRIS-Verdünner (pH 7,0; 333 mOsm/kg) sowie der Laktose-Eidotter-Verdünner nach SEAGER, 1969 (pH 5,9; 405 mOsm/kg) überprüft. Als dritter Verdünner wurde ein modifizierter Laktose-Eidotter-Verdünner nach SEAGER mit einem Glyzeringehalt von 8% (Originalverdünner 4%) benutzt. Der Laktose-Eidotter-Verdünner enthält im Gegensatz zum TRIS-Verdünner keine puffernden Bestandteile. Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, Prozentsatz lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität wurden nach der Verdünnung sowie nach dem Auftauen bestimmt. GILL et al. (1970) erzielten mit dem TRIS-Verdünner Auftauraten von 79% motilen Spermien, in der vorliegenden Arbeit lagen die Auftauraten bei 47%. Beim Laktose-Eidotter-Verdünner kam es zu einer deutlichen Reduzierung der Motilität der verdünnten Spermaproben nach dem Auftauen (von 73% nach der Verdünnung auf 14% nach dem Auftauen beim Originalverdünner mit 4% Glyzerin). Die von VAN GEMERT (1970) mit pelletiertem Sperma erzielten Auftauraten von 80% vorwärtsbeweglichen Spermien waren mit der Technik des

Einfrierens in Pailletten nicht zu wiederholen.

Der Einfluß des sauren pH des Laktose-Eidotter-Verdünners (pH 5,9) wurde weiter untersucht, indem der pH des TRIS-Verdünners auf diesen Wert gesenkt wurde und der Laktose-Eidotter-Verdünnern auf pH 7,0 erhöht wurde. Unabhängig von der Art des Verdünners kam es wie in Untersuchungen von EMMENS (1947) im sauren Bereich zu einer starken Reduzierung der Auftauraten. Mit Hilfe des Prozentsatzes lebender Spermien ließen sich diese Unterschiede hingegen nicht aufzeigen.

Bei der Modifizierung der Osmolalität (modifizierter TRIS-Verdünnern nach GILL et al. mit 405 mOsm/kg; modifizierter Laktose-Eidotter-Verdünnern nach SEAGER mit 333 mOsm/kg) ergab die Untersuchung der Parameter Motilität, Prozentsatz lebender Spermien und extrazelluläre GOT-Aktivität hingegen ähnliche Werte wie bei den Originalverdünnern. Die Modifizierung des osmotischen Druckes beeinflusste demnach im Gegensatz zur Modifizierung des pH die untersuchten Parameter nicht abweichend voneinander.

SCHLUSSFOLGERUNG:

Die Vielzahl der in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Verdünnern läßt den Schluß zu, daß bei der Entwicklung von Spermaverdünnern meist empirisch vorgegangen wird. Diese empirische Verfahrensweise wird sich bei der weiteren Entwicklung von Verdünnern zur Samenkonservierung vorerst nicht ersetzen lassen, jedoch sollte dabei verstärkt Augenmerk auf pH und osmotischen Druck der Verdünnern gerichtet werden.

Nachdem hohe Motilitätsraten keine Gewähr für die Integrität der Samenzellen und damit für die Qualität des verdünnten

Samens bieten, sollte die Beurteilung der Motilität des verdünnten Spermas als zentraler Punkt der Spermauntersuchungen durch objektive Verfahren zur Bestimmung von Membranschädigungen (wie Prozentsatz der Spermien mit normalem apikalen Rand, Messung der extrazellulären GOT-Aktivität) ergänzt werden.

Dem Zusatz von Verdünnerbestandteilen, die eine gute Erhaltung der Motilität ermöglichen (wie z.B. BSA), sollte vermehrt Aufmerksamkeit geschenkt werden.

5.

ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung von pH und Osmolalität sowie spezieller Komponenten (Puffersubstanzen, Makromoleküle) von Sperma verdünnern für die Konservierung von Samenzellen zu untersuchen. Dies wurde am Modell von in der Praxis der künstlichen Besamung bewährten Verdünnern zur Flüssigkonservierung von Eber-, Hengst- und Rüdensperma sowie zur Tiefgefrierkonservierung von Hengst- und Rüdensperma durchgeführt. Als Parameter für die Untersuchungen mit Ebersperma wurden der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher Spermien, die extrazelluläre GOT-Aktivität und die lichtmikroskopische Beurteilung der Akrosomintegrität verwendet. Bei den Versuchen mit Hengst- und Rüdensamen wurden der Prozentsatz vorwärtsbeweglicher und lebender Spermien (Lebend-Tot-Färbung mit Bromphenolblau-Nigrosin) und die extrazelluläre GOT-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

In verschiedenen, für eine Spezies beschriebenen Verdünnern sind z.T. erhebliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung (Puffersubstanzen, Proteinzusätze, Elektrolyte, Energieträger) gegeben. Dies führt, zumindest bei den zur Flüssigkonservierung von Ebersamen benutzten Verdünnern, auch zu entsprechenden Variationen des pH-Wertes und der Osmolalität.

In ihrer Zusammensetzung differierende Verdünnern bedingen nur zum Teil auch mit den hier verwendeten Parametern nachweisbare unterschiedliche Konservierungseigenschaften. Beim Schwein konnten anhand aller verwendeten Parameter Unterschiede zwischen den Verdünnern (Beltsville-, Kiew- und Zorlesco-Verdünnern) nachgewiesen werden. Beim Hengst konnten die voneinander abweichenden Konservierungseigenschaften der Verdünnern zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierung nur anhand der Motilitätsraten belegt werden. Beim Rüden wurden neben signifikanten Unterschie-

den der Motilität z.T. auch variierende GOT-Aktivitäten beim Einsatz der beschriebenen Verdünner festgestellt.

Aus den Untersuchungen mit den Originalrezepturen zur Samenkonservierung beim Hengst und Rüden geht hervor, daß ein pH-Wert unter 6,0 unabhängig von der sonstigen Zusammensetzung des Verdünners zu einer gewissen Reduzierung der Konservierungseigenschaften führt. Dies wird auch durch die Untersuchungen belegt, in denen der pH-Wert von Verdünnern auf Bereiche unter 6,0 gesenkt wurde.

Geringe Unterschiede der Osmolalität im hypertonen Bereich (300 - 400 mOsm/kg) zwischen Verdünnern konnten keine nachweisbaren Effekte bezüglich der Konservierungseigenschaften auslösen. Beim Eber führte ein hypotoner osmotischer Druck (271 mOsm/kg) unabhängig von der sonstigen Zusammensetzung des Verdünners zu einer deutlichen Membranschädigung, die anhand der extrazellulären GOT-Aktivität und der Akrosommorphologie nachgewiesen werden konnte.

Variationen der Konzentrationen an Puffersubstanzen (Tri-Natriumzitat-2-Hydrat, Tris (hydroxymethyl)-aminomethan) bzw. von Glycerin in einem Verdünner haben ebenfalls Einfluß auf dessen Konservierungseigenschaften. Proteinzusätze (wie z.B. Bovines Serum Albumin), die pH und Osmolalität nicht verändern, können die Eigenschaften eines Verdünners (Erhaltung der Motilität) positiv beeinflussen. Beim Hengst konnte nachgewiesen werden, daß eine Entfernung des Seminalplasmas mittels Zentrifugation des Spermas die Motilität in flüssig- und tiefgefrorenen Spermaproben verbessert.

Die Messung der extrazellulären GOT-Aktivität und die morphologische Beurteilung der Akrosomintegrität erlauben eine differenziertere Beurteilung der Einflüsse von Spermaverdünnern als die alleinige Schätzung der Bewegungsaktivität der Spermien.

6. SUMMARY

Comparison of extenders for semen preservation in the pig, horse and dog with special reference to their physical properties.

In this investigation the influence of pH and osmolality and special constituents of current extenders for artificial insemination (buffers, high molecular substances) were examined. The liquid storage of boar, dog and stallion semen and the cryopreservation of stallion and dog semen were investigated. All sperm samples were evaluated by percentage of progressive motile spermatozoa and extracellular GOT-activity. Acrosome integrity was only determined in boar spermatozoa. Viability tests with a brominephenolblue-nigrosin staining procedure were made in stallion and dog spermatozoa. The results are summarized as follows:

Concerning the composition (buffers, addition of proteins, electrolytes, nutritive substances) there exist differences in various extenders suitable for a certain species. Thereby especially the extenders for the liquid storage of boar semen differ considerably in pH and osmolality.

Various compositions of extenders do not generally lead to different preserving properties which can be demonstrated by the parameters used in this investigation. In all extenders used for liquid storage of boar semen (Beltsville-, Kiew- and Zorlesco-extender) remarkable differences could be demonstrated by these parameters. The extenders used for the liquid storage and cryopreservation of stallion semen showed only differences concerning the motility of the diluted spermatozoa. There were significant differences between the extenders for the liquid storage and cryopreservation of dog semen in motility and to a lower extent in extracellular GOT-activity.

The examinations of the original extenders used for stallion and dog semen indicate a negative influence on preserving properties below pH 6,0 without regard to the composition of the extenders and their modifications used in this study.

Variations of the osmolality in hypertone extenders (300 - 400 mOsm/kg) did not change the preserving properties. In the boar a hypotone osmotic pressure (271 mOsm/kg) always led to a remarkable damage of membrane integrity regardless the composition of the extender.

Various concentrations of buffers (tri-sodiumcitrate-2-hydrate, tris (hydroxymethyl)-aminomethan) and of glycerol also influence the preserving properties of extenders. Addition of proteins (e.g. Bovine Serum Albumine), which do not alter pH and osmolality, can positively influence the motility. Furthermore it was demonstrated that the removal of seminal-plasma by means of centrifugation of stallion semen improved motility in liquid stored and frozen spermatozoa.

A more precise evaluation of the influences of extenders can be rendered possible by the examination of extracellular GOT-activity than by a single estimation of motility.

7. LITERATURVERZEICHNIS

AALBERS, J.G., RADEMAKER, J.H.M., GROOTEN, H.J.G. and L.A. JOHNSON (1983):

Fecundity of boar semen stored in BTS, Kiev, Zorlesco and Modena extenders under field conditions
J.Anim.Sci. 57, Suppl. 1, 314 - 315

ABDOU, M.S.S. and M.M. EL-GUINDI (1977):

Effect of disodium EDTA on the fructolytic activity of bull semen
Zentbl.Vet.Med. 24 A, 575 - 579

ALVAREZ, J.G. and B.T. STOREY (1983):

Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility
Biol.Reprod. 29, 548 - 555

AMLID, T., BLICKFELDT, T. and S. ERIK (1984):

Trials with different diluting fluids for boar AI semen
10th Internat.Congr.Anim.Reprod. and AI, Urbana - Champaign, Vol.I, 182, Vol.II, 182

ANDERSEN, K. (1972):

Fertility of frozen semen
Acta Vet.Scand. 13, 128 - 130

ANDERSEN, K. (1975):

Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique
Zuchthyg. 10, 1 - 4

ANDERSON, E.W., PICKETT, B.W., VOSS, J.K. and J.E. CRANWELL (1980):
The relationship between motility and fertility of frozen stallion semen

9th Internat.Congr.Anim.Reprod. and AI, Madrid, Vol.III, 371

BADER, H. (1970):

Weite Erfahrungen über die Tiefgefrierung von Hengstsperma
Zuchthyg. 5, 87

BAHLAU, E. (1958):

Untersuchungen über die Konservierung von Hundesperma
Vet.-med.Diss., München

BARTOOV, B. and A. MAYEVSKY (1980):

The effect of pH on ram sperm collective motility driven by mitochondrial respiration
Int.J. of Androl. 3, 602 - 612

BAUMGARTL, Chr. (1980):

Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen über Veränderungen der Plasmamembran und Akrosomenstruktur von Pferdespermien

Vet.-med.Diss., Hannover

BERGMEYER, H.U. (1970):

Methoden der enzymatischen Analyse

Verlag: Chemie Weinheim, 2. Aufl., 685 - 688

BERNSTEIN, G.S. (1958):

Effect of ethylenediamine tetraacetic acid (Versene) on motility, oxygen consumption, and anaerobic fructolysis of human sperm
Fertil.Steril. 9, 120 - 133

BIALY, G., LUDWICK, T.M., HESS, E.A. and F. ELY (1957):

Influence of lipoprotein on the freezing of bovine spermatozoa
J.Dairy Sci. 40, 1189 - 1192

BIEDERMANN, H. (1951):

Gewinnung, Beschaffenheit und Verdünnung des Spermas vom Hund

Vet.-med.Diss., Hannover

BIELANSKI, W. (1975):

The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination

J.Reprod.Fert., Suppl. 23, 19 - 24

BLACKSHAW, A.W. and C.W. EMMENS (1951):

The interaction of pH, osmotic pressure and electrolyte concentration on the motility of ram, bull and human spermatozoa

J.Physiol. 114, 16 - 26

BONNADONNA, T. und L. OLGIATI (1953):

Dell identificazione dei nemaspermi di "Bos Taurus" vivi e morti con la colorazione bleu bromo-fenolo e nigrosina

Zootec. e vet. 8, 195 - 199

BOWER, R.E., CRABO, B.G., PACE, M.M. and E.F. GRAHAM (1973):

Effect of dilution on the release of glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) from boar spermatozoa

J.Anim.Sci. 36, 319 - 324

BREDDERMANN, P.J. and R.H. FOOTE (1971):

Factors stabilizing bull sperm cell volume and prolonging motility at high dilution

Exptl. Cell Res. 66, 458 - 464

BROWN, K.I., CRABO, B.G., GRAHAM, E.F. and M.M. PACE (1971):
Some factors affecting loss of intracellular enzymes from
spermatozoa
Cryobiology 8, 220- 224

CHANG, M.C. and T. THORSTEINSSON (1958):
Effects of osmotic pressure and hydrogen-ion concentration on
the motility and fertilizing capacity of rabbit spermatozoa
Fertil. Steril. 9, 510 - 520

COCHRAN, J.D., AMANN, R.P., FROMAN, D.P. and B.W. PICKETT (1984):
Effects of centrifugation, glycerol level, cooling to 5°C,
freezing rate and thawing rate on the postthaw motility of
equine sperm
Theriogenology 21, im Druck

COOPER, W.L. and N.E. WERT (1975):
Wintertime breeding of mares using artificial light and
insemination: Six years' experience
Proc. Am. Ass. Equine Practnrs., Boston, 245 - 253

DAVIS, J.S., BRATTON, R.W. and R.H. FOOTE (1963):
Livability of bovine spermatozoa at +5°C, -25°C and -85°C in
TRIS-buffered and citrate-buffered yolk-glycerol-extenders
J. Dairy Sci. 46, 333 - 336

DEMICK, D.S., VOSS, J.L. and B.W. PICKETT (1976):
Effect of cooling, storage, glycerolisation and spermatozoa
numbers on equine fertility
J. Anim. Sci. 43, 633 - 637

DEMINATUS, F. (1956):
Die Tiefkühlung des Bullenspermas
Vet.-med. Diss., Hannover

DREVIUS, L.-O. and H. ERIKSSON (1966):
Osmotic swelling of mammalian spermatozoa
Exptl. Cell Res. 42, 136 - 156

DREVIUS, L.-O. (1972):
Bull spermatozoa as osmometers
J. Reprod. Fert. 28, 29 - 39

DUIJN, C. van and R. RIKMENSPOEL (1960):
The mean velocity and velocity distributions of normal bull
spermatozoa at different hydrogen-ion concentrations derived
from photo-electric measurements
J. Agric. Sci. 54, 300 - 309

EBERTUS, R. (1962):
Die Verdünnung von Hengstsperma mit Rindervollmilch
Mh. Vet. Med. 17, 618

ELLERY, J.C., GRAHAM, E.F. and R. ZEMJANIS (1971):
Artificial insemination of pony mares with semen frozen and
stored in liquid nitrogen
Am.J.Vet.Res. 32, 1693 - 1698

EMMENS, C.W. (1947):
The motility and viability of rabbit spermatozoa at
different hydrogen-ion concentrations
J.Physiol. 106, 471 - 481

EMMENS, C.W. and G.I.M. SWYER (1948):
Observations on the motility of rabbit spermatozoa in
dilute suspension
J.gen.Physiol. 32, 121 - 138

FAZANO, F., LONING, I. und WEITZE, K.F. (1982):
Osmotischer Druck und Spermienwerte in
flüssigkonserviertem Schweinesperma
VII.Vet.-Humanmed. Tagung, Gießen, 172 - 174

FISCHER-PEREIRA CUNHA, A. (1979):
Vergleichende Untersuchungen zur künstlichen Besamung beim
Schwein unter besonderer Berücksichtigung des SCK 7-Verdünners
Vet.-med.Diss., Berlin

FISER, P.S. and G.A. LANGFORD (1981):
Cryosurvival of ram sperm as influenced by diluent
osmolality
Fert.Steril. 36 (2), 265 - 266

FLIPSE, R.J., PATTONS, S. and J.O. ALMQUIST (1954):
Diluters for bovine semen. III. Effect of lactenin and
lactoperoxidase upon spermatozoan livability
J.Dairy Sci. 37, 1205 - 1211

FLIPSE, R.J. (1960):
Metabolism of bovine semen: GOT and GPT activities
J.Dairy Sci. 43, 773 - 776

FOOTE, R.H. and E.P. LEONHARD (1964):
The influence of pH, osmotic pressure, glycine and glycerol on
the survival of dog sperm in buffered-yolk extenders
Cornell Vet. 54, 78 - 89

FOOTE, R.H. (1970):
Influence of extender, extension rate, and glycerolating
technique on fertility of frozen bull semen
J.Dairy Sci. 53, 1478 - 1482

- FOULKES, J.A. (1977):
The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect
on the motility and integrity of bovine spermatozoa
J.Reprod.Fert. 49, 277 - 284
- GASTAUER, R. (1974):
Beitrag zu Enzymaktivitäten und Elektrolytkonzentrationen
im Blutserum und Seminalplasma beim Bullen
Vet.-med.Diss., München
- GEMERT, W. van (1970):
Diepvries-pups
Tijdschr.Diergeneesk. 95, 697 - 699
- GILL, H.P., KAUFMAN, C.F., FOOTE, R.H. and R.W. KIRK (1970):
Artificial insemination of beagle bitches with freshly
collected, liquid-stored and frozen-stored semen
Am.J.Vet.Res. 31, 1807 - 1813
- GLATZEL, P., EL HOUSSAIN, K. und A. TIBARY (1981):
Pferde- und Eselhengste der marokkanischen Landespferde- und
Maultierzucht. Erste Ergebnisse aus dem Einsatz von Flüssig-
und Gefriersamen für die Maultierproduktion
Berl.Münch.tierärztl.Wschr. 22, 445 - 448
- GODDEAUX, S.D. and J.L. KREIDER (1978):
Motility and fertility of stallion spermatozoa
isolated in bovine serum albumine
Theriogenology 10, 405 - 414
- GÖTZE, R. (1949):
Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere
Hannover, Schaper Verlag
- GOTTARDI, L., BRUNEL, L. and L. ZANELLI (1980):
New dilution media for artificial insemination in pig
IXth Internat.Congr.Anim.Reprod. and AI, Madrid, Vol.III, 275
- GOTTARDI, L. (1983):
Persönliche Mitteilung
- GRAHAM, E.F. and M.M. PACE (1967):
Some biochemical changes in spermatozoa due to freezing
Cryobiology 4, 75 - 84
- GRAHAM, E.F., SCHMEHL, M.K.L. and M. MAKI-LAURILA (1970):
Some physical and chemical methods of evaluating semen
3rd Tech.Conf.A.I.Reprod., N.A.A.B. Chicago, 44 - 48

GRAHAM, E.F., RAJAMANNAN, A.H., SCHMEHL, M.K.L., MAKI-LAURILA, M. and R.E. BOWER (1971):

Preliminary reports on procedure and rationale for freezing boar semen
A.I.Digest 19, 12 - 14

GRAHAM, E.F. and B.G. CRABO (1972):

Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa

VIIth Internat. Congr. Anim. Reprod. and A.I. Munich, 1627 - 1632

GUAY, P., RONDEAU, M. and S. BOCHER (1981):

Effect of glycerol on motility, viability, extracellular aspartate aminotransferase release and fertility of stallion semen before and after freezing
Equine vet.J. 13, 177 - 182

HAEGER, O. und N. MÄCKLE (1971):

Ein Zweiphasenverdünnungsmittel in der Praxis der Schweinebesamung
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 78, 395 - 397

HANCOCK, J.L. (1956):

The morphology of boar spermatozoa
J.R.Micr.Soc. 76, 84 - 97

HARRISON, R.A.P., DOTT, H.M. and G.C. FOSTER (1978):

Effect of ionic strength, serum albumin and other macromolecules on the maintenance of motility and the surface of mammalian spermatozoa in a simple medium
J.Reprod.Fert. 52, 65 - 73

HARROP, A.E. (1954):

Artificial insemination of a bitch with preserved semen
Brit.Vet.J. 110, 424 - 425

HEALEY, P. (1969):

Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoa of some domestic animals
J.Reprod.Fert. 18, 21 - 27

HEIDRICH, S. (1977):

Ein Beitrag zur Tiefgefrierung von Rüdensperma
Vet.-med.Diss., Berlin

HELLEMANN, C. (1976):

Motilität und Akrosomintegrität als Fruchtbarkeitsparameter von tiefgefrorenem Kaninchensperma
Vet.-med.Diss., Hannover

HERAK, M., HERAK, M. und J. LONCARIC (1967):

Veränderungen der Transaminaseaktivität im Ebersperma und ihre Beziehung zur Beweglichkeit der Spermien
Fortpfl.Haust. 3, 238 - 242

HESS, R., SCHÄFER, W., SCHMIDT, D. und W. BAUM (1968):
Versuche zur Pelletierung von Hengstsperma
Fortpfl. Haust. 4, 207 - 314

HEYDORN, K.-P. und S. PAUFLE (1975):
Vergleichende Untersuchungen der einphasigen und zweiphasigen
Verdünnung des Eberspermas und seine Auswirkungen auf die
Trächtigkeitsergebnisse
Züchtungskunde 47, 303 - 310

HILLMANN, K.-H. (1972):
Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von
Ebersamen mit dem Beltsville-F-3-Verdüner
Vet.-med. Diss., Hannover

HILLMANN, K.-H. und H. TREU (1973):
Zur Tiefgefrierung von Ebersperma
1. Mitteilung: Darstellung und Messung morphologischer und en-
zymatischer Veränderungen beim Tiefgefrieren von Eberspermien
Zuchthyg. 8, 105 - 112

HILLMANN, K.-H. und H. TREU (1974):
Zum Vorkommen der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase in Hengstsam-
en und ihre Beziehung zu anderen Eigenschaften des Spermas
Zuchthyg. 9, 129 - 136

HOLST, W. van der (1983):
Persönliche Mitteilung

HUGHES, J. P. and R. G. LOY (1970):
Artificial insemination in the equine. A comparison of natural
breeding and artificial insemination of mares using semen from
six stallions
Cornell Vet. 60, 463 - 475

JOHNSON, P. E., FLIPSE, R. J. and J. O. ALMQUIST (1955):
Diluters for bovine semen. VI. The effect of cysteine hydro-
chlorid on the livability of bull spermatozoa in unheated skim
milk
J. Dairy Sci. 38, 53 - 58

JOHNSON, L. A., AALBERS, J. G., WILLEMS, C. M. T., RADEMAKER, J. H. M.
and C. E. REXROAD (1982):
Use of boar spermatozoa for A. I. 3. Fecundity of boar sperma-
tozoa stored in Beltsville liquid and Kiev extenders for
three days at 18°C
J. Anim. Sci. 54, 132 - 136

JONES, R. C. (1973):
The plasma membrane of ram, boar and bull spermatozoa
J. Reprod. Fert. 33, 179 - 183

KAMPSCHMIDT, R.F., MAYER, D.T. and H.A. HERMAN (1953):
Lipid and lipoprotein constituents of egg yolk in
the resistance and storage of bull spermatozoa
J.Dairy Sci. 36, 733 - 742

KATTUS, A.A. (1956):
Serum aminopherase (transaminase) in diagnosis
of acute myocardial infarction
J.Am.Med. Ass. 160, 16

KEREKGARTO, S.C. (1977):
Persönliche Mitteilung
Zit. nach FISCHER-PEREIRA CUNHA, A. (1979):
Vergleichende Untersuchungen zur künstlichen Besamung beim
Schwein unter besonderer Berücksichtigung des SCK 7-Verdünners
Vet.-med.Diss., Berlin

KLENNER, A. (1975):
Auswirkungen der Tiefgefrierkonservierung auf die Akrosom- und
GOI-Aktivität sowie die Akrosomenmorphologie von Eberspermien
Vet.-med.Diss., München

LADUE, J.S., WROBELEWSKI, F. and A. KARMEN (1954):
Serum glutamic transaminase activity in human
acute transmural myocardial infarction
Science 120, 497 - 499

LANZ, R.N., PICKETT, B.W. and R.J. KOMAREK (1965):
Effect of lipid additives on pre- and post-freeze
survival of bovine spermatozoa
J.Dairy Sci. 48, 1692 - 1697

LARSSON, K., DARENIUS, K. and K. JOHANSSON (1980):
Sperm morphology and in vitro viability in diluted
semen in relation to fertility of AI boars
Nord.Vet.Med. 32, 533 - 542

LEIDL, W. (1968):
Neue Verfahren in der künstlichen Besamung der Wirbeltiere
Vith Internat.Congr.Anim.Reprod.and A.I., Paris, Vol.II, 951 - 965

LINDHOLMER, C. (1974):
Toxity of zinc ions to human spermatozoa and
the influence of albumin
Andrologia 6, 7 - 16

MAKLER, A., DAVID, R., BLUMENFELD, Z. and O.S. BETTER (1981):
Factors affecting sperm motility. VII. Sperm viability as affect-
ed by change of pH and osmolality of semen and urine specimens
Fertil.Steril. 36, 507 - 511

- MARTIN, I.C.A. (1963 a):
The freezing of dog spermatozoa to -79°C
Res.Vet.Sci. 4, 304 - 314
- MARTIN, I.C.A. (1963 b):
The deep-freezing of dog spermatozoa in diluents
containing skim-milk
Res.Vet.Sci. 4, 315 - 325
- MARTIN, I.C.A. (1963 c):
Effects of lecithin, egg yolk, fructose and period
of storage at 5°C on bull spermatozoa deep-frozen to -79°C
J.Reprod.Fert. 6, 441 - 449
- MARTIN, J.C., KLUG, E. and A.R. GONZEL (1979):
Centrifugation of stallion semen and its
storage in large volume straws
J.Reprod.Fert.Suppl. 27, 47 - 51
- MERKT, H (1976):
Equine artificial insemination
Vet.Rec. 99, 69 - 71
- MERKT, H. und D. KRAUSE (1966):
Tiefgefrierversuche mit Equidensperma unter
Anwendung des sog. Pelletverfahrens
Dtsch.Tierärztl.Wschr. 73, 267 - 268
- MEYER, G. (1951):
Versuche zum Zentrifugieren des Hengstspermas
Vet.-med.Diss., Hannover
- MÖLLER, H., STERBA, G., BROCKNER, G., HOFMANN, I. und
LEHMANN (1977):
Zur Genese der Plasmamembran-Veränderungen bei SchafbockspERMien
Biol.Zbl. 96, 571 - 579
- NAGASE, H. and T. NIWA (1964):
Deep freezing bull semen in concentrated pellet form
Vth Internat.Congr.Anim.Reprod. and A.I., Trento, 410 - 415
- NAGASE, H., SOEJIMA, A., NIWA, T., OSHIDA, H., SAGARA, Y.,
ISHIZUKA, N. and S. HOSHI (1966 a):
Studies on the freezing storage of stallion semen
I. Fertility results of stallion frozen semen in
concentrated pellet form
Jap.J.Anim.Reprod. 12, 48 - 51

NAGASE, H., SOEJIMA, S., TOMIZUKA, T., OSHIDA, H., MIKAWA, T.,
SAGARA, Y., HOSHI, S. and T. NIWA (1966 b):

Studies on the freezing of stallion semen

II. Factors affecting survival rates of stallion spermatozoa
after freezing and thawing and results of a fertility trial
Jap. Anim. Reprod. 12, 52 - 57

NAUMENKOV, A. und N. ROMANKOVA (1981):

Sovershenstvovanie razbavitelya semeni
Konevodstvo i Konnyi Sport 4, 34

NEVES, J. P. (1980):

Untersuchungen zur Samenübertragung beim Schaf unter besonde-
rer Berücksichtigung der Spermatiefgefrierkonservierung
Vet.-med. Diss., Hannover

NEVILLE, W. J., MACPHERSON, J. W. and G. J. KING (1970):

The contraceptive action of glycerol in gilts
J. Anim. Sci. 31, 227

NISHIKAVA, Y. (1975):

Studies on the preservation of raw and frozen horse semen
J. Reprod. Fert. Suppl. 23, 99 - 104

PACE, M. M. and E. F. GRAHAM (1970):

The release of glutamic oxalacetic transaminase from bovine
spermatozoa as a test method of assessing semen quality and
fertility

Biol. Reprod. 3, 140 - 146

PAPA, F. O., PFEILSTICKER, J., MARRE, H., KRAUSE, D.

und K. F. WEITZE (1982):

Problematik der Beziehung zwischen spermatologischen Parametern
und Besamungsergebnissen nach Anwendung von tiefgefrorenem
Bullensperma

VII. Vet.-Humanmed. Tagung, Gießen, 113 - 116

PAQUIGNON, M., BARITEAU, F., BUSSIÈRE, J. et M. COUROT (1979):

Conservation prolongée du sperme frais de verrat

Journées Rech. Porcine en France, 323 - 328

PAQUIGNON, M., BUSSIÈRE, J., BARITEAU, F., LE MIGNAN DE KERANGAT,
G. et M. COUROT (1980 a):

Efficacité des dilueurs Guelph et SCK 7 pour la conservation
prolongée à l'état liquide du sperme de verrat

Journées Rech. Porcine en France, 157 - 160

PAQUIGNON, M., DACHEUX, J. L., BARITEAU, F. et M. COUROT (1980 b):
Effect of levels of BSA on survival of boar spermatozoa
in different storage media at 15°C

IXth Internat. Congr. Anim. Reprod. and A. I., Madrid, 273

PHILLIPS, P.H. (1939):
Preservation of bull semen
J. biol. Chem. 130, 415

PICKETT, B.W., BURWASH, D.C., VOSS, J.L. and D.G. BACK (1975 a):
Effect of seminal extenders on equine fertility
J. Anim. Sci. 40, 1136 - 1143

PICKETT, B.W., SULLIVAN, J.J., BYERS, W.W., PACE, M.M.
and E.E. REMMENG (1975 b):
Effect of centrifugation and seminal plasma on motility
and fertility of stallion and bull spermatozoa
Fertil. Steril. 26, 167 - 174

PLISKI, N.T. (1965):
A method for prolonging the viability and fertilising
ability of boar spermatozoa (russ.)
Zit. nach Anim. Breed. Abstr. 34, 89
Svinovodstvo 19, 37 - 41

POLGE, C., SMITH, A.U. and A.S. PARKES (1949):
Revival of spermatozoa after vitrification and
dehydration at low temperatures
Nature 164, 666

POLGE, C. (1951):
Functional survival of fowl spermatozoa after freezing at -79°C
Nature 167, 949 - 950

POLGE, C. (1956):
Artificial insemination in pigs
Vet. Rec. 68, 62 - 76

POLGE, C., SALOMON, S. and J. WILMUT (1970):
Fertilizing capacity of frozen boar semen following
surgical insemination
Vet. Rec. 87, 424 - 429

PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A. and R.J. GERRITS (1969):
GOT and LDH activities of boar spermatozoa and seminal plasma
J. Reprod. Fert. 18, 176

PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A. and R.J. GERRITS (1970):
Distribution of glutamic oxalacetic transaminase and lactic de-
hydrogenase activities in boar semen after cold shock and
freezing
Cryobiology 7, 141 - 144

PURSEL, V.G., JOHNSON, L.A. and L.L. SCHULMAN (1971):
Fertility with boar semen stored at 15°C for 5 days
J. Anim. Sci. 42, 927 - 932

PURSEL, V.G. and L.H. JOHNSON (1975):
Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity
with concentrated semen and a new thawing procedure
J.Anim.Sci. 40, 99 - 102

PURSEL, V.G., SCHULMAN, L.L. and L.A. JOHNSON (1978):
Effect of Orvus Es paste on acrosome morphology, motility and
fertilizing capacity of frozen thawed boar sperm
J.Anim.Sci. 47, 198 - 202

PURSEL, V.G. (1983):
Preservation of boar semen above 15°C: Effects of
storage temperature, extender and container
J.Anim.Sci.Suppl.1, 57, 125 - 126

QUINN, P.J. and WHITE (1968):
The effect of pH, cations and protective agents on
the susceptibility of ram spermatozoa to cold shock
Exptl.Cell Res. 49, 31 - 39

QUINN, P.J., WHITE, I.G. and K.W. CLEVELAND (1969):
Chemical and ultrastructural changes in ram
spermatozoa after washing, cold shock and freezing
J.Reprod.Fert. 18, 209 - 220

RATZ, K.H. und A. MATTHEUS (1972):
Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Transaminase-
Konzentrationen und anderen Parametern des Ejakulates
Andrologie 4 (4), 355 - 361

RAJAMANNAN, A.H.J., ZEMJANIS, R. and J. ELLERY (1968):
Freezing and fertility studies with stallion semen
VIth Internat.Congr.Reprod.Anim.Insem.Artif., Paris
Vol.II, 1601 - 1604

REED, H. (1976):
Persönliche Mitteilung
Zit. nach PAQUIGNON, M., BARITEAU, F., BUSSIERE, J. et
M. COUROT (1979)
Conservation prolongee du sperme frais de verrat
Journées Rech.Porcine en France, 323 - 328

RICHTER, L. und A. LIEDICKE (1972):
Ein Verfahren zum Tiefgefrieren von Ebersperma
Proc. VIIth Internat.Congr.Anim.Reprod.AI, München, 1618 - 1621

RCMBE, S.M. and V.A. KOTYAGNIA (1968):
Long term preservation of stallion semen
Proc. VIth Internat.Congr.Anim.Reprod. and AI, Paris, 1606

ROMENY, E., TREU, H. und L. RICHTER (1974):

Zur Tiefgefrierung von Ebersperma

5. Mitteilung: Labor- und Besamungsversuche zur Verbesserung des "Hülsebergverfahrens"

Dtsch. Tierärztl. Wschr. 16, 382 - 385

ROUSSEL, J.D. and O.T. STALLCUP (1965):

Parallelism between semen characteristics and glutamic oxalacetic transaminase, glutamic pyruvic transaminase activities

J. Dairy Sci. 48, 1684 - 1687

ROY, A. and M.W.H. BISHOP (1954):

Effect of glycine on the survival of bull spermatozoa in vitro

Nature 174, 746 - 747

SAACKE, R.G. and J.M. WHITE (1972):

Semen quality tests and their relationship to fertility

Proc. IVth Techn. Conf. Anim. Reprod. Artif. Insem.

Nat. Ass. Anim. Breed., Chicago, 22 - 27

SEAGER, S.W.J. (1969):

Successful pregnancies utilizing frozen dog semen

A.I. Digest 17, 6, 16

SEAGER, S.W.J. and W.S. FLETCHER (1972):

Collection, storage and insemination of canine semen

Lab. Anim. Sci. 22, 177 - 182

SEAGER, S.W.J. and W.S. FLETCHER (1973):

Progress on the use of frozen semen in the dog

Vet. Rec. 92, 6 - 10

SENEGACNIK, J. (1982):

Verhalten von Rinder- und Eberspermien in verschiedenen

Pufferlösungen unter Nativ- und Einfrierbedingungen

Fachtagung Wels, 1982

SIEGEL, S. (1976):

Nichtparametrische statistische Methoden

Fachbuchhandlung für Psychologie, Verlagsabteilung

Frankfurt a.M.

SIMMET, L. (1974):

Zur Technik der Samengewinnung und -verpackung beim Schwein

Der Tierzüchter 3, 102 - 106

SMIRNOV, J.V. and A.Z. YEMETZ (1972):

Osmotic pressure of bull semen and its importance in freezing

VIIth Internat. Congr. Anim. Reprod. A.I., Munich,

Summaries, 494

SMITH, F.O. and E.F. GRAHAM (1984):
Cryopreservation of canine semen: Technique and performance
10th Internat. Congr. Anim. Reprod. and A.I.,
Urbana-Champaign, Vol. I, 216

SCHEID, I.R. (1980):
Tiefgefrierkonservierung von Ebersamen in Kunststoffrohren; Er-
probung der Gefrierschutzsubstanzen Glycerin, Dimethylsulfoxid
und Acetamid
Vet.-med. Diss., Hannover

SCHILLING, E., VENGUST, M. and D. SMIDT (1984):
Prediction of the quality of boar spermatozoa after
freezing and long storage
10th Internat. Congr. Anim. Reprod. and A.I.,
Urbana-Champaign, Vol. I, 64

STANGER, J.D. and P. QUINN (1983):
The relationship between motility and the FITC-BSA
binding properties of mouse epididymal spermatozoa
Journ. of Exp. Zool. 227, 323 - 327

STEINBACH, J. and R.H. FOOTE (1967):
Osmotic pressure and pH effects on survival of frozen
bovine spermatozoa
J. Dairy Sci. 50, 205 - 213

STREZEZEK, J. and J. SLAWETA (1984):
Application of chosen biochemical indexes for biological
quality of boar semen stored at 15 - 18°C
10th Internat. Congr. Anim. Reprod. and A.I., Urbana-
Champaign, Vol. I, 64, Vol. II, 67

THACKER, D.L. and J.O. ALMQUIST (1953):
Diluters for bovine semen. I. Fertility and motility
in boiled milk
J. Dairy Sci. 36, 173 - 179

TISCHNER, M., NYTKO, M. and W. BIELANSKI (1980):
The effect of osmotic pressure, pH and the freezing-
thawing process on sperm velocity in stallions
9th Internat. Congr. Anim. Reprod. and A.I., Madrid
Vol. III, 373

VLACHOS, K. (1963):
Pferdebesamung in Griechenland unter besonderer
Berücksichtigung einiger Sterilitätsursachen bei Stuten
Dtsch. Tierärztl. Wschr. 70, 326 - 329

VOGLMAYR, J.K., WHITE, I.G. and P.J. QUINN (1969):
A comparison of adenosinetriphosphatase activity in
testicular and ejaculated spermatozoa of the ram
Biol.Reprod. 1, 121 - 129

WALES, R.G. and I.G. WHITE (1963):
Viability of diluted dog spermatozoa in vitro
J.Reprod.Fert. 5, 67 - 76

WARNAWSKI, A.N. (1971):
Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen
von Kälteschäden an Bullen- und Schafbockspermien
Fortpfl. Haust. 7, 15 - 33

WATSON, P.F. and I.C.A. MARTIN (1972):
A comparison of changes in the acrosomes of deep
frozen ram and bull spermatozoa
J.Reprod.Fert. 28, 99 - 101

WEITZE, K.F. (1977 a):
Untersuchungen zur Tiefgefrierkonservierung von Kaninchensperma
Habil.-Schr., Tierärztliche Hochschule, Hannover

WEITZE, K.F. (1977 b):
Gefrierschädigung und Gefrierschutz im Rahmen der
Tiefgefrierkonservierung lebenden Materials unter
besonderer Berücksichtigung der Säugersamenzellen
Dtsch.Tierärztl.Wschr. 84, 402 - 406, 441 - 446, 481 - 484

WHITE, A.A. and W.C. HESS (1958):
Some alterations in serum enzymes in progressive
muscular dystrophy
Proc.Soc.Exptl.Biol.Med. 94, 541 - 544

WILMUT, I. and C. POLGE (1971):
Recent progress in the deep-freeze preservation of boar semen
J.Reprod.Fert. 25, 301 - 302

WILMUT, I. and C. POLGE (1972):
The deep freezing of boar spermatozoa
VII. Int.Kongr.tier.Fortpfl.u.Haustierbes., München
Vol.II, 1612 - 1615

WILMUT, I. and C. POLGE (1977 a):
The low temperature preservation of boar spermatozoa. 1. The mo-
tility and morphology of boar spermatozoa in the presence of
permeating protective agents
Cryobiology 14, 471 - 478

WILMUT, I and C. POLGE (1977 b):

The low temperature preservation of boar spermatozoa. 2. The motility and morphology of boar spermatozoa frozen and thawed in diluent which contained only sugar and egg yolk

Criobiology 14, 479 - 482

Weiterhin wurde folgende Literatur verwendet:

BLACKSHAW, A.W. (1953)

The motility of ram and bull spermatozoa in dilute suspension
J.gen. Physiol. 36, 449 - 462

NAGASE, H. und E.F. GRAHAM (1964)

Pelleted semen: Comparison of different extenders and processes on fertility of bovine spermatozoa 5th.int.Congr.
Anim. Reprod.Art.Insem., Trento 4, 387 - 391

Herrn Professor Dr. W. Leidl möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas und besonders für die jederzeit gewährte und über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehende wertvolle Unterstützung danken.

Allen Mitarbeitern des Lehrstuhls, insbesondere aber Frau R. Haitchi und Herrn Dr. P. Glatzel sei für ihre Anregungen und Ratschläge herzlich gedankt.

Herrn Professor Dr. Dr. K. Osterkorn, Lehrstuhl für Tierzucht, danke ich für seine Hinweise zu den statistischen Methoden.

Den Leitern der Besamungsstationen Bergheim, Grub und Wels/ Oberösterreich, Herrn Dr. Aumüller, Herrn Dr. Haeger und Herrn Dr. Fischerleitner sowie Herrn Dr. Gottardi von der Besamungsstation Zorlesco-Casalpusterlengo/Italien danke ich für die praktischen Hinweise.

Mein besonderer Dank gilt Frau H. Hüttig und Fräulein S. Hüttig sowie Herrn T. Riedl für das Schreiben der Manuskripte.

Für die Mitarbeit bei den statistischen Berechnungen danke ich Frau Dr. I. Moravek und Herrn Dr. A. Kober, Allianz-Zentrum für Technik, Ismaning.

LEBENS LAUF

Am 25.6.1956 wurde ich, Christoph Anton Bruno Kober, als erstes von 4 Kindern der Studienrätin Annemarie Kober - Krinner, geb. Krinner und ihres Ehemannes Dr.-Ing. Armin Kober in München geboren.

1963 - 1966	Besuch der Volksschule Bochum-Querenburg
1967 - 1976	Besuch des Luitpold-Gymnasiums, München
1976	Abitur
1976 - 1977	Wehrdienst als Sanitäter in Stetten am kalten Markt und Ingolstadt
1977 - 1982	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
Januar 1983	Approbation als Tierarzt Beginn der Dissertation
Sept. - Dez. 1983 und April - Juni 1984	Anstellung als teilzeitbeschäftigte, wissenschaftliche Hilfskraft an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik, München

